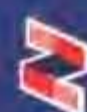
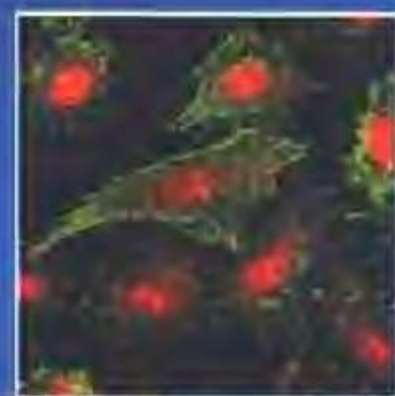
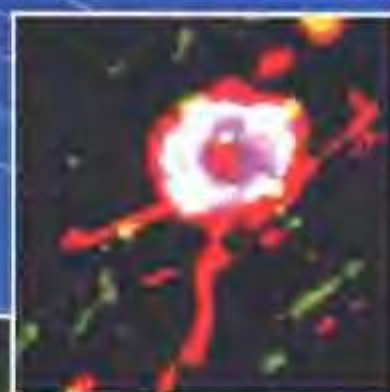
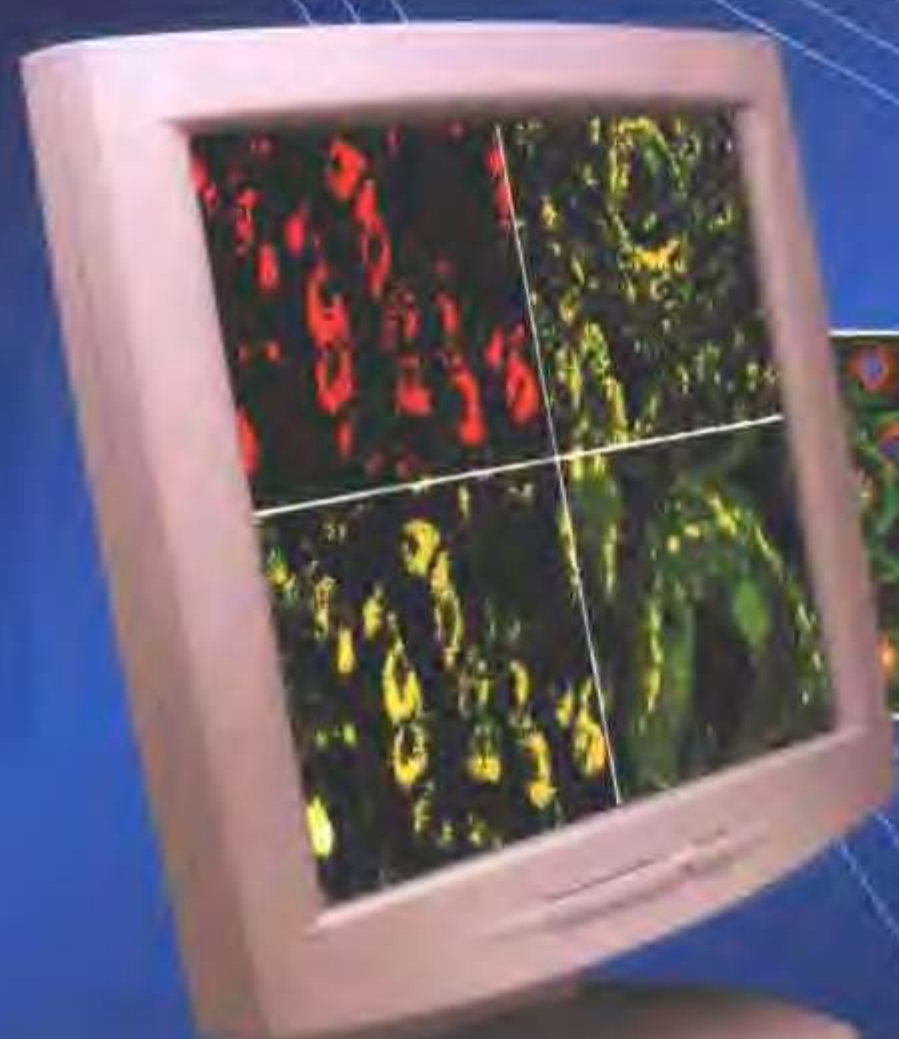
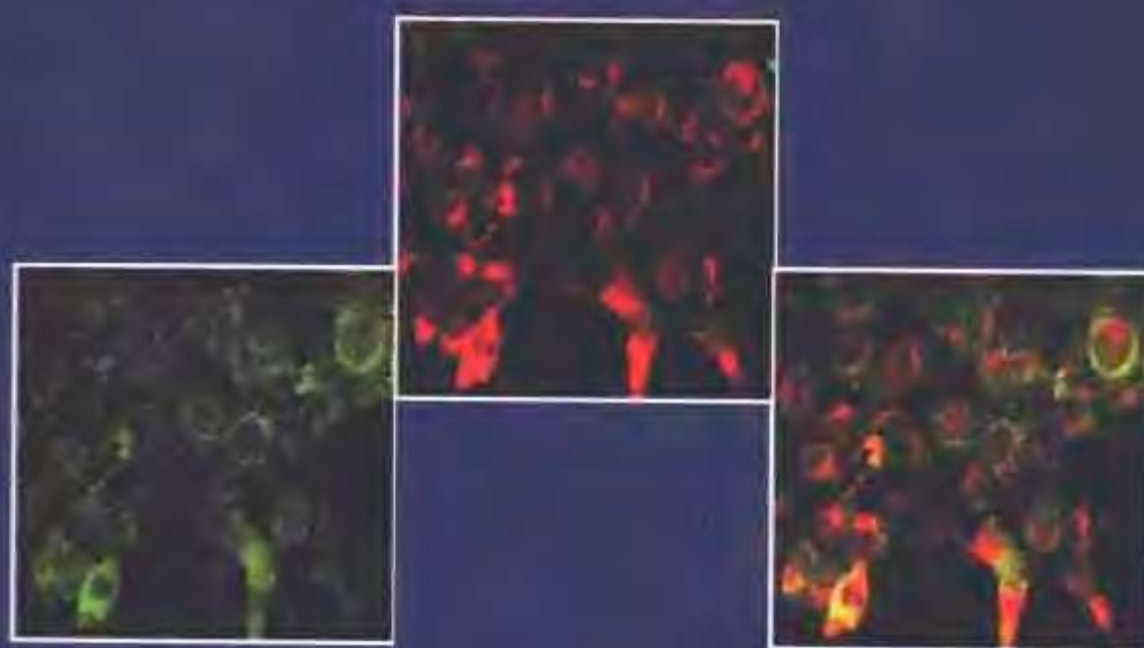


激光扫描 共聚焦 显微镜技术

主编 王春梅 黄晓峰
杨家骥 陈志南



第四军医大学出版社



激光扫描共聚焦显微镜技术

责任编辑 徐文丽 封面设计 郑晓都

ISBN 7-81086-087-9



9 787810 860871 >

ISBN 7-81086-087-9/R · 77

定价:58.00元

激光扫描共聚焦显微镜技术

主编 王春梅 黄晓峰 杨家骥 陈志南

编者 (以姓氏笔画为序)

于 华	马 东	马 兴	马向东
王 栋	王文军	王春梅	刘东军
刘丽宏	李 楠	杨家骥	吴小明
陈 丹	陈志南	周宏志	袁 明
高前应	黄晓峰	黄善金	商立军
程 康	廉喜红	臧伟进	臧益民
裴建明			

第四军医大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

激光扫描共聚焦显微镜技术/王春梅, 黄晓峰, 杨家骥, 陈志南主编. —西安: 第四军医大学出版社, 2004.7

ISBN 7-81086-087-9

I. 激… II. ①王… ②黄… ③杨… ④陈… III. 激光显微镜-应用-生物医学工程-概论
IV. R318.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 021159 号

激光扫描共聚焦显微镜技术

主 编 王春梅 黄晓峰 杨家骥 陈志南

责任编辑 徐文丽

出版发行 第四军医大学出版社

地 址 西安市长乐西路 17 号 (邮编: 710032)

电 话 029-83376765

传 真 029-83376764

网 址 <http://press.fmmu.sn.cn>

印 刷 人民日报社西安印务中心

版 次 2004 年 7 月第 1 版 2004 年 7 月第 1 次印刷

开 本 880×1230 1/16

印 张 25

字 数 650 千字

书 号 ISBN 7-81086-087-9/R·77

定 价 58.00 元

(版权所有 盗版必究)

前 言

随着科学技术的发展,实验技术已经成为实现实验目的的重要手段,对实验技术的了解和掌握是科技工作者应具备的技能。激光扫描共聚焦显微镜是激光、电子摄像和计算机图像处理等现代高科技手段渗透,并与传统的光学显微镜结合产生的先进的细胞分子生物学分析仪器,在生物医学各领域的应用越来越广泛,已成为生物医学实验研究的必备工具。本书正是基于这一目的编写的,以期为广大科技工作者提供一部系统了解和使用激光扫描共聚焦显微镜技术的参考资料。

全书共分四篇二十九章。第一篇主要介绍了激光扫描共聚焦显微镜技术的基本原理,包括图像采集、图像处理和动态荧光测量的基本技术。第二篇侧重激光扫描共聚焦显微镜的具体应用。对钙离子的转运、钙库测定、分泌现象的钙离子控制机制、钙调蛋白依赖的蛋白激酶的激活、钙通道的分子生物学基础进行了专门论述。并对 pH 值测定、钙离子测定、海胆受精成像、完整胚胎的活细胞共聚焦成像以及果蝇荧光原位杂交、基因和蛋白表达的分析方法进行了介绍。为方便科研人员进行实验操作,第三篇简要介绍激光扫描共聚焦显微镜使用的荧光探针及其染色技术,并对与共聚焦显微镜应用密切相关的组织学技术和免疫荧光细胞化学技术、亲和组织化学技术也进行了专门介绍。第四篇介绍了激光扫描共聚焦显微镜技术在植物学研究中的应用。附录介绍了免疫荧光细胞化学技术常用的试剂和具体配制方法。全书除介绍基本原理外,侧重于实用,对实验中应注意的问题进行了详细说明。本书还特意编排了 40 余幅共聚焦显微镜在不同领域实际应用的彩图,以飨读者。

编者由第四军医大学、中国农业大学、中山大学、内蒙古大学、陕西农林科技大学、西安交通大学、解放军总医院及海军总医院的多位专家和生物医学领域的中青年学者组成,都是长期从事生物医学研究的实践者。由于集体执笔,文风不完全一致,资料的选择和观点的阐述也可能因实践经验的不同而存在差异,错漏在所难免,希望广大读者批评指正。

本书的顺利付梓也是第四军医大学出版社同志们辛勤工作的结果,他们为本书的设计和撰写提供了许多宝贵意见;在本书的编写过程中我们还参考了 S.W. Paddock 编写的《Confocal Microscopy: Methods and Protocols》和 J.W. Putney 编写的《Calcium Signaling》;本科室的研究生黄小军和李珍在书稿的校对方面花费了大量的时间和精力;张文斌教授、王冰水副教授、曲萍、张富兴、王安辉和刘仲荣同志为本书提供了部分彩图;在此对所有支持和帮助过我们的人们一并表示衷心的感谢。

编 者

2004 年 6 月 10 日

目 录

第一篇 激光扫描共聚焦显微镜基本原理

第一章 激光扫描共聚焦显微镜原理	(3)
第一节 概述	(3)
一、共聚焦方法的发展	(3)
二、激光扫描共聚焦显微镜的结构	(5)
三、共聚焦显微镜图像模式	(6)
第二节 标本制备和图像采集	(11)
一、物镜	(11)
二、荧光探针	(13)
三、自发荧光	(14)
四、图像采集	(15)
五、故障排除	(16)
六、图像处理和出版	(17)
第三节 相关资讯	(17)
第二章 图像采集	(19)
一、三维图像构建	(19)
二、材料	(20)
三、方法	(22)
第三章 激光扫描共聚焦显微镜的测量	(29)
一、测量前的准备工作	(29)
二、深度和厚度测量	(30)
三、长度、面积和体积的测量	(31)
四、荧光强度的测量	(32)
第四章 图像的三维重建	(35)
一、材料	(35)
二、方法	(35)
第五章 图像的信息管理	(41)
一、数据库的类型	(41)
二、图像数据的存储	(42)
三、数据库的建立	(43)
四、图像保存以及图像格式	(44)
第六章 图像变形技术和数字电影	(46)
一、材料	(46)
二、方法	(48)
三、注意事项	(51)
第七章 细胞体积的原位动态测量	(53)
一、材料	(53)

二、方法	(54)
三、注意事项	(63)

第二篇 激光扫描共聚焦显微镜应用

第八章 钙转运的机制和细胞内钙的测定	(67)
第一节 钙的转运及其机制	(67)
一、钙代谢简述	(67)
二、血钙的转运及其调节	(68)
三、细胞钙及其转运	(70)
四、钙与细胞代谢反应调节	(75)
第二节 细胞内钙的测定	(76)
一、化学荧光指示剂	(77)
二、生物发光钙指示剂	(80)
三、指示剂负载方法	(81)
四、钙指示剂的定标和估计	(83)
五、 Ca^{2+} 指示剂的潜在问题及解决办法	(85)
六、测量 Ca^{2+} 的技术	(87)
七、测量 Ca^{2+} 的步骤及注意事项	(88)
第九章 分泌作用的钙离子控制	(90)
第一节 细胞外分泌机制	(90)
一、SNARE 假说	(90)
二、 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} 粘蛋白在调节分泌中的作用	(90)
三、 Ca^{2+} 通道	(91)
四、胞内钙池	(91)
五、钙依赖分泌	(91)
第二节 研究分泌的方法	(92)
一、完整细胞、渗透细胞和无细胞系统	(92)
二、单个细胞	(92)
第三节 分泌过程中胞内 Ca^{2+} 测定	(93)
一、完整细胞	(93)
二、渗透细胞和无细胞系统	(95)
第四节 分泌时胞内钙测量	(97)
一、平均 Ca^{2+} 浓度	(97)
二、限定亚细胞区域的 Ca^{2+} 浓度	(98)
第十章 细胞亚组分的分离和细胞内钙库研究	(99)
第一节 非肌细胞	(99)
一、 Ca^{2+} 库的位置	(99)
二、 Ca^{2+} 库的纯化技术	(100)
三、 Ca^{2+} 库的性质	(105)
第二节 肌细胞	(107)
一、 Ca^{2+} 库的定位	(107)

二、 Ca^{2+} 库的纯化技术	(107)
三、 Ca^{2+} 库的性质	(109)
第十一章 研究钙信号的蟾蜍卵母细胞	(112)
第一节 钙信号	(112)
一、 Ca^{2+} 信号的胞内成分	(112)
二、 Ca^{2+} 释放	(113)
三、钙诱导的钙释放	(113)
四、用蟾蜍属卵母细胞研究钙信号的优点	(114)
第二节 钙信号的控制	(114)
一、肌浆网钙-ATP 酶 (SERCA) 和钙信号	(114)
二、钙释放控制和钙网硬蛋白摄取	(115)
三、钙释放的线粒体控制	(116)
第三节 蟾蜍属卵母细胞系统的实际操作方法	(117)
第十二章 细胞内 pH 及 pCa 测定	(121)
一、材料	(121)
二、方法	(122)
第十三章 钙调蛋白依赖蛋白激酶的激活	(125)
第一节 钙调蛋白依赖蛋白激酶	(126)
一、钙调蛋白激酶	(126)
二、钙调蛋白激酶的三维结构	(127)
三、CaM 结合于钙调蛋白激酶	(128)
四、CaM 的 C 端结构域与蛋白激酶疏水端保守序列的相互作用	(128)
五、CaM 的 124 位蛋氨酸调节钙调蛋白激酶的活性	(129)
六、CaM 的 N 端结构域中疏水残基对不同 CaM 依赖性蛋白激酶的影响	(130)
七、CaM 依赖激酶与 CaM 之间的氢键和静电作用对 CaM 依赖激酶活化的调节	(130)
第二节 Ca^{2+} 在 CaM 依赖的蛋白激酶调节中的作用	(131)
一、CaM 与 CaM 结合肽相互作用的 Ca^{2+} 依赖性	(131)
二、酶结合的 Ca^{2+} 依赖和 CaM 的激活	(131)
第十四章 钙通道的分子生物学	(134)
第一节 克隆储存操纵通道的策略	(134)
第二节 果蝇 TRP 和 TRPL 蛋白的同族体	(135)
一、RT-PCR 识别哺乳动物 TRP 同族体	(135)
二、通过数据库分析识别 TRP 相关基因	(136)
三、TRP 蛋白的多样性	(138)
四、哺乳动物 TRP 蛋白的初级结构和跨膜结构	(138)
五、TRP 同族体的组织特异性表达	(139)
六、哺乳动物 TRP 通道功能性表达相关的方法	(142)
第十五章 海胆受精成像	(143)
一、材料	(143)
二、方法	(144)
第十六章 完整胚胎活细胞共聚焦成像	(148)
第一节 材料和方法	(148)

一、材料	(148)
二、方法	(149)
三、注意事项	(151)
第二节 激光扫描共聚焦显微镜在哺乳动物胚胎发育研究方面的应用	(155)
第十七章 用荧光探针进行基因表达分析	(157)
一、材料	(158)
二、方法	(158)
第十八章 果蝇荧光原位杂交单标和双标方法	(164)
一、材料	(164)
二、方法	(165)
第十九章 用蛋白荧光标记技术进行活体共聚焦分析	(170)
一、材料	(170)
二、方法	(171)
三、注意事项	(175)

第三篇 荧光探针及其应用技术

第二十章 荧光探针的发展简史	(179)
第一节 荧光染色和荧光探针	(179)
一、荧光染色	(179)
二、荧光的发射原理	(179)
三、荧光与荧光物质的分子结构	(179)
四、荧光探针	(180)
第二节 染料的合成及荧光染料的早期应用	(180)
第三节 荧光探针在活细胞中的应用和发展	(181)
第四节 体内荧光探针	(182)
第二十一章 荧光探针的性质及滤光片的选择	(183)
第一节 荧光探针的性质	(183)
一、激发波长和发射波长	(183)
二、荧光强度	(183)
三、荧光寿命	(183)
四、光稳定性	(183)
五、染料分子间的相互作用	(184)
六、染料分子对环境的敏感性	(184)
第二节 滤光片的选择	(185)
一、常用的光源	(185)
二、滤光片的分类	(185)
三、滤光片的选择原则	(186)
第三节 荧光抗衰减剂的选择	(190)
一、常用的抗荧光衰减剂	(190)
二、抗荧光衰减(淬灭)试剂盒	(191)
第二十二章 荧光探针及其染色技术	(193)

第一节 荧光探针负载(染色)原则及注意事项	(193)
第二节 常用的染色方法	(194)
一、酯化荧光探针染色法	(194)
二、显微注射法	(194)
三、透膜剂法	(195)
第三节 常用荧光探针的染色方法	(195)
一、BCECF 测定 pH 值	(195)
二、SNARF-1 定量比率测定 pH 值	(195)
三、Indo-1 测定细胞内 Ca^{2+}	(195)
四、Fluo-3 测定细胞内 Ca^{2+}	(196)
五、CFDA 测定细胞间通讯	(196)
六、DiBAC ₄ 测定细胞膜电位	(196)
七、Rhodamine 123 标记活细胞线粒体	(196)
八、AO 显示 RNA 和 DNA	(197)
九、PI 显示 DNA	(197)
第四节 荧光探针的校正	(197)
第二十三章 常用荧光探针	(198)
第一节 测定细胞活性的荧光探针	(198)
一、细胞活性和细胞毒性试剂盒	(198)
二、活细胞探针	(200)
三、死细胞探针	(202)
第二节 膜荧光探针	(203)
一、膜脂的特点和膜探针的应用	(204)
二、膜流动性测定的荧光探针	(204)
三、荧光基团标记的磷脂	(205)
四、阴离子膜探针	(213)
五、阳离子膜探针	(219)
六、其他非极性和双亲性膜探针	(223)
第三节 细胞器探针	(227)
一、线粒体探针	(228)
二、溶酶体、酵母菌液泡和其他酸性细胞器探针	(238)
三、内质网和高尔基复合体探针	(241)
第四节 pH 荧光探针	(246)
一、近中性 pH 应用的探针	(246)
二、酸性 pH 使用的探针	(251)
三、pH 探针交联物	(253)
第五节 细胞骨架蛋白荧光探针	(255)
一、肌动蛋白荧光探针	(256)
二、微管蛋白和其他细胞骨架蛋白探针	(266)
第二十四章 荧光探针的选择和应用	(271)
第一节 选择荧光探针的注意事项	(271)
一、选择荧光探针的一般考虑	(271)

二、使用荧光探针的注意事项	(271)
第二节 激光扫描共聚焦显微镜常用的荧光探针	(271)
一、细胞内游离钙	(272)
二、DNA 和 RNA	(272)
三、膜电位	(272)
四、pH 值	(273)
五、细胞内活性氧	(273)
六、细胞间通讯	(273)
七、细胞膜流动性	(273)
八、细胞亚微结构(细胞器)探针	(273)
九、标记抗体、配体等常用的荧光探针	(274)
十、检测酶活性的荧光探针	(274)
第三节 激光扫描共聚焦显微镜中荧光探针的使用	(274)
一、购买荧光探针的一般考虑	(275)
二、探针选择	(275)
三、荧光探针到达后的保存	(276)
四、将荧光探针制备成溶液	(276)
五、探针溶液的储存	(277)
六、做好背底检查	(277)
七、标记	(278)
八、荧光信号的检测	(278)
九、光漂白	(279)
十、环境影响因素	(280)
十一、仪器因素	(280)
十二、以 FITC 作为 LSCM 探针的例子	(281)
第四节 使用花青类染料进行 LSCM 荧光双标记	(281)
第二十五章 常用组织学技术	(283)
第一节 免疫荧光组织化学细胞和组织标本的制备	(283)
一、细胞标本的取材	(283)
二、组织标本的取材	(284)
第二节 细胞和组织的固定	(284)
一、固定的目的	(284)
二、固定剂	(284)
三、固定方法	(286)
第三节 组织切片技术	(287)
一、冰冻切片	(287)
二、石蜡切片	(288)
三、振动切片	(288)
四、塑料切片	(288)
五、超薄切片	(289)
六、碳蜡切片	(289)
七、玻片处理和涂胶	(289)

第四节 常用组织学研究方法	(289)
一、一般光学显微镜术	(289)
二、几种特殊显微镜的应用	(290)
三、组织化学和细胞化学术	(291)
四、免疫细胞化学术	(291)
五、放射性核素示踪术	(292)
六、原位杂交术	(293)
七、细胞和细胞化学定量术	(293)
八、电子显微镜术	(294)
九、组织培养术	(294)
十、细胞融合术	(295)
第二十六章 免疫荧光细胞化学技术	(296)
第一节 有关的免疫学基础理论	(297)
一、抗原、抗体的概念及抗原抗体的关系	(297)
二、抗原的性质和种类	(297)
三、抗体的性质和种类	(298)
四、抗原与抗体的反应	(299)
五、抗体形成的机制	(300)
六、补体系统	(301)
第二节 免疫荧光细胞化学的基本原理	(301)
一、直接法	(301)
二、间接法	(302)
三、补体法	(302)
四、双重免疫荧光标记法	(302)
五、对照实验	(303)
第三节 荧光抗体的制备	(303)
一、荧光素	(303)
二、荧光素标记抗体的方法	(304)
三、荧光抗体质量控制	(307)
四、荧光抗体的保存	(309)
第四节 免疫荧光细胞化学染色方法	(309)
一、标本制作	(309)
二、荧光抗体染色方法	(309)
三、荧光抗原染色法	(310)
第五节 荧光显微镜检查法	(311)
一、荧光显微镜	(311)
二、荧光显微镜标本制作要求	(313)
三、使用荧光显微镜的注意事项	(313)
四、荧光图像的记录方法	(314)
第六节 非特异性染色的消除方法	(314)
一、非特异性染色的主要因素	(314)
二、消除非特异性染色的方法	(314)

第二十七章 亲合组织化学技术	(317)
第一节 抗生物素-生物素免疫细胞化学染色法	(317)
一、基本原理	(317)
二、几种抗生物素-生物素染色法	(317)
第二节 葡萄球菌蛋白 A (SPA)	(319)
一、SPA 的性质	(320)
二、SPA 的应用	(320)
三、SPA 在免疫细胞化学染色中的应用	(321)
第三节 凝集素	(322)
一、凝集素的特性	(322)
二、凝集素的应用	(322)
三、凝集素在免疫细胞化学中的应用	(324)
四、HRP 标记凝集素及凝集素抗体的制备	(325)
第四节 免疫细胞化学技术的某些进展	(326)

第四篇 共聚焦显微镜技术在植物学研究中的应用

第二十八章 植物细胞样品制备	(329)
第一节 植物细胞的特点	(329)
一、细胞壁	(329)
二、液泡	(330)
三、叶绿体	(330)
第二节 材料和方法	(330)
一、材料	(330)
二、方法	(332)
第二十九章 植物细胞骨架研究	(339)
第一节 植物细胞中细胞骨架结构的共聚焦显微镜观察	(339)
一、植物微管阵列的观察	(339)
二、植物微丝骨架的共聚焦显微镜观察	(340)
三、植物细胞骨架的三维图像构建	(341)
第二节 植物细胞骨架动态的共聚焦显微镜观察	(341)
一、荧光类似物细胞化学法	(341)
二、荧光漂白恢复技术	(342)
第三节 绿色荧光蛋白 (GFP) 与共聚焦显微镜观察	(343)
第四节 植物材料共聚焦显微镜观察的制片方法	(343)
一、植物材料制片中需注意的问题	(343)
二、植物材料的制片步骤	(344)
附录一 细胞生物学名词解释	(348)
附录二 免疫细胞化学常用试剂及其配制方法	(352)
参考文献	(365)
彩 图	(373)

第一篇

激光扫描共聚焦显微镜基本原理

第一章 激光扫描共聚焦显微镜原理

第一节 概述

激光扫描共聚焦显微镜 (laser scanning confocal microscope, LSCM) 在生物医学领域的主要应用是通过一种或多种荧光探针标记后可对固定的组织或活体标本进行观察研究。当这些标本用普通荧光光学显微镜观察时, 来自焦点以外的其他区域的荧光对结构的分辨率干扰较大, 尤其是标本的厚度在 $2\mu\text{m}$ 以上时, 其影响更为明显 (图 1-1)。共聚焦方法可排除“焦点以外”荧光的干扰使侧向和轴向分辨率提高。LSCM 的分辨率比普通宽视野光学显微镜的分辨率高 (最大理论分辨率为 $0.2\mu\text{m}$), 透射电子显微镜的分辨率可达到 0.1nm 。因此, LSCM 在这两种最常用的形态学技术间架起了桥梁。

LSCM 的成像方法与普通宽视野光学显微镜不同, 在普通宽视野光学显微镜中, 整个标本全部都被水银弧光灯或氙灯的光线照明, 图像可用肉眼直接观察。而共聚焦通过 1 束或多束聚焦的光线对标本进行扫描, 使共聚焦显微镜获得照明, 光源通常为激光, 以这种方式扫描标本所得的图像称为光学切片 (面)。这种图像的采集方法是通过仪器进行的一种无损伤性的方法, 它使用光线而不是使用机械方式完成对标本的切片。共聚焦方法适用于活细胞标本的图像采集, 并以 Z 扫描的方式自动完成三维 (3D) 数据的采集, 改善多标记标本的图像质量。

LSCM 在生物医学领域的应用越来越广泛, 成为许多研究人员的首选仪器。但对于许多第一次接触 LSCM 的初学者, 可能会遇到许多问题, 因此本书着重讲述 LSCM 在具体应用时应注意的事项、使用技巧、适用范围等。在生物学成像领域中有各种型号的共聚焦显微镜, 结构原理基本相同, 本书所描述的各种操作步骤、样品制备的方法基本都可在其他仪器使用。同时可通过其他技术获得更好的光学切片, 包括去卷积 (deconvolution) 技术和多光子成像技术。

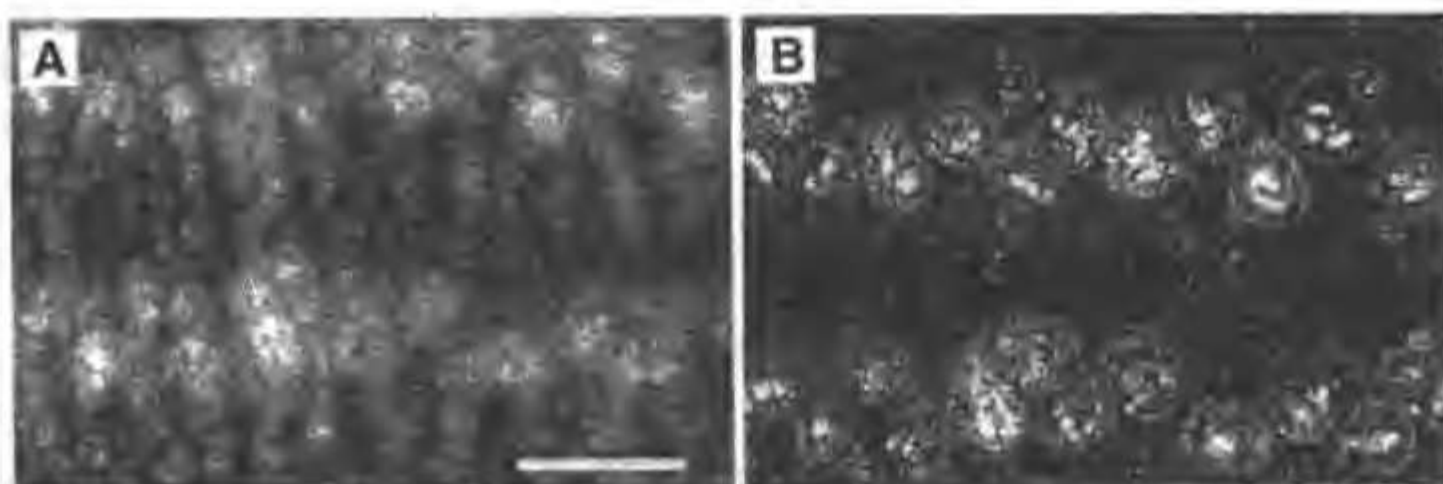


图 1-1 普通荧光图像与共聚焦荧光图像的比较。整片蝴蝶蛹翅上皮用碘化丙锭染色后, 同一区域普通荧光显微镜图像 (A) 和共聚焦显微镜图像 (B) 的比较。共聚焦显微镜观察时由于排除了焦点外荧光的干扰, 因此分辨率大大提高 (B)

一、共聚焦方法的发展

共聚焦显微镜的发明归功于 Marvin Minsky, 他在 1955 年基于在不染色的活体脑组织观察神经网络的目的, 建立了一台工作显微镜。1957 年提出了共聚焦显微镜技术的基本原理, 并获得了美国的专利。

所有现代共聚焦显微镜采用的共聚焦成像原理都是基于 1957 年的专利。Egger 和 Petran 在 1967 年成功的应用共聚焦显微镜产生了一个光学横断切面, 1977 年, Sheppard 和 Wilson 首次描述了光与被照明物体原子之间的非线性关系和激光扫描器的拉曼光谱学, 1987 年, White 和 Amos 在 Nature 发表了“共聚焦显微镜时代的到来”一文, 标志着 LSCM 已成为进行科学研究的重要工具。

传统的光学显微镜使用的实际上是场光源, 由于光散射, 在所观察的视野内, 样品上的每一点都同时被照射并成像, 入射光照射到整个细胞的一定厚度, 位于焦平面外的反射光也可通过物镜面成像, 使图像的信噪比降低, 影响了图像的清晰度和分辨率。此外, 传统的光学显微镜也只能对局部作平面成像, 而 LSCM 脱离了这种模式 (图 1-2), 采用激光束做光源, 激光束经照明针孔, 经由分光镜反射至物

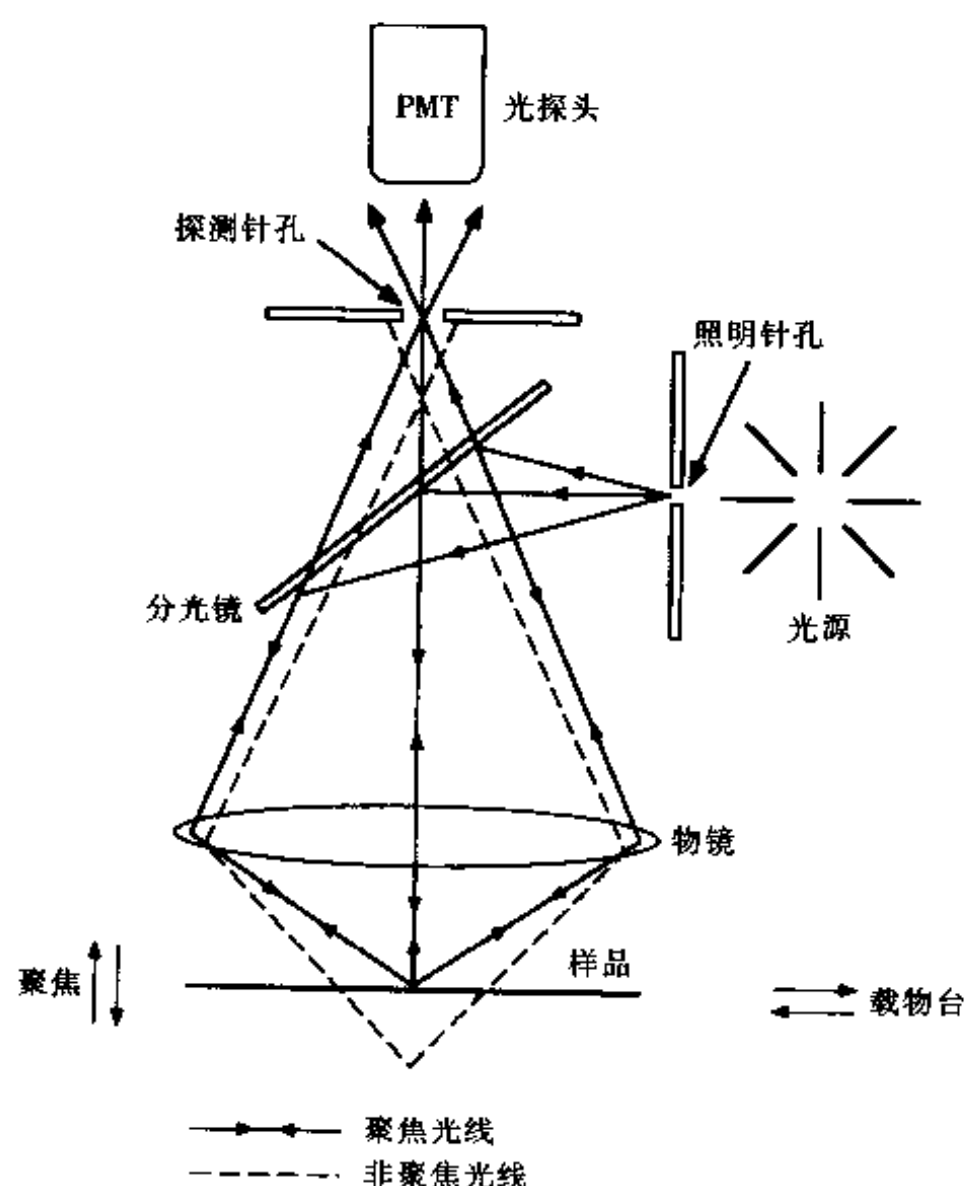


图 1-2 平台扫描式 LSCM 光路图

镜, 并聚焦于样品上, 对标本内焦平面上每一点进行扫描。然后, 激发出的荧光经原来入射光路直接反向回到分光镜, 通过探测针孔时先聚焦, 聚焦后的光被光电倍增管 (photomultiple tube, PMT) 探测收集, 并将信号输送到计算机, 在彩色显示器上显示图像。在这个光路中, 只有在焦平面上的光才能穿过探测针孔, 焦平面以外区域射来的光线在探测小孔平面是离焦的, 不能通过小孔。因此, 非观察点的背景呈黑色, 反差增加, 成像清晰。由于照明针孔与探测针孔相对于物镜焦平面是共轭的, 焦平面上的点同时聚焦于照明针孔和探测针孔, 焦平面以外的点不会在探测针孔处成像, 即共聚焦。以激光做光源并对样品进行扫描, 在此过程中两次聚焦故称为激光扫描共聚焦显微镜。

现代的共聚焦显微镜, 图像可通过 PMT 输出产生, 也可用数字式电荷耦合器件 (charge-coupled device, CCD) 的相机捕获, 并可直接用计算机图像系统进行处理, 在高分辨率视频显示器呈现, 同时可将所有数据储存在硬盘中。

近几十年来, 光学显微镜的光学部件改变不大, 仪器的最终分辨率取决于光线的波长、物镜和标本本身的性质。但在近 20 年, 用于增强标本反差的相关技术和染料方法有了长足的进步, 与共聚焦有关的重要技术进展有: 更加明亮稳定的多波长激光、更有效的反射镜、敏感的低噪音光探测器、带有图像处理功能的快速计算机、分析图像的高智能软件、高分辨率的视频显示和数字打印。这些技术从 1955 年以来, 分别独立发展起来, 已经用于现代的共聚焦图像系统。如数字图像处理技术, 由 Shinya Inoue 和 Robert Allen 在 20 世纪 80 年代初期首先应用于生物学图像, 他们用装在显微镜上的视频相机捕获图像, 而后连接到数字图像处理器, 经数字图像增强后, 使特定结构的分辨率得到明显加强。如要观察刚刚超过光镜的理论分辨率的细胞内微管结构, 使用微分的干涉 (DIC) 光学附件可获得图像, 并可通过数字方法进一步增强。

共聚焦显微镜常根据扫描样品所使用的方法进行分类。台阶式扫描共聚焦显微镜在材料科学领域应用较多, 如微芯片工业, 基于这一原理的系统最近在生物医学领域被广泛应用于筛选微芯片上的 DNA。

通过光线移动, 而标本不动进行扫描的共聚焦显微镜对生物学标本更具实用价值, 大多数科研显微

镜采用的就是这种方式。光束扫描有两种不同的方法：多束扫描和单束扫描。目前最常用的是单束扫描，在 LSCM 更是如此。扫描是通过计算机控制的反射镜完成的，扫描速度为每秒 1 帧。在某些系统，也可通过声光装置或振荡反射镜进行接近视频速度的快速扫描。采用回旋 Nipkow 盘，可用多光束对标本进行实时扫描。该系统的前身是串联扫描显微镜 (tandem scanning microscopy, TSM)，通过进一步改进，对多荧光标记标本进行图像采集。

目前共聚焦显微镜在技术上可使用两种不同的方式生成光学切片：去卷积法和多光子成像。去卷积方法是一种基于计算机的方法，可计算并除去来自焦点以外的荧光图像的信息。多光子显微镜使用的扫描系统与 LSCM 相同，只是没有针孔，这是因为激光仅在焦点激发荧光色素，因此不需要针孔。这种方法，可降低光漂白作用，非常适用于对活组织的观察。

二、激光扫描共聚焦显微镜的结构

LSCM 是以普通光学显微镜为基础建立的，使用激光作为光源，采用敏感的 PMT 探测器，计算机控制扫描反射镜并使图像的采集和显示更容易。图像可使用计算机媒质进行储存，并借助计算机多种软件进行分析。可使用共聚焦显微镜本身自带的软件，也可使用其他计算机应用软件 (图 1-3)。

LSCM 照明光源被限制为点光源，该点通过物镜聚焦在标本上，扫描装置使光点进行逐行扫描。来自标本的发射光首先被针孔后的 PMT 检测，而后将图像输出到计算机 (图 1-2)。

LSCM 解决了发育生物学的基本问题，使得 LSCM 在商业上获得成功。White 等用免疫荧光标记法使得胚胎的大分子物质成功显示 (White JG, *et al.* J Cell Biol, 1987;105:41~48)。胚胎内的许多结构使用普通光学显微镜无法观察到，因为虽然细胞数增加，但胚胎的大小几乎保持不变，这样来自越来越多的密集细胞的荧光强度将增加，有些细胞将无法保持在焦平面上，来自焦平面以外的荧光将使图像的分辨率下降。在采用 LSCM 后，通过“光学切片”作用，排除了焦点外的荧光干扰，使他们顺利完成了对早期

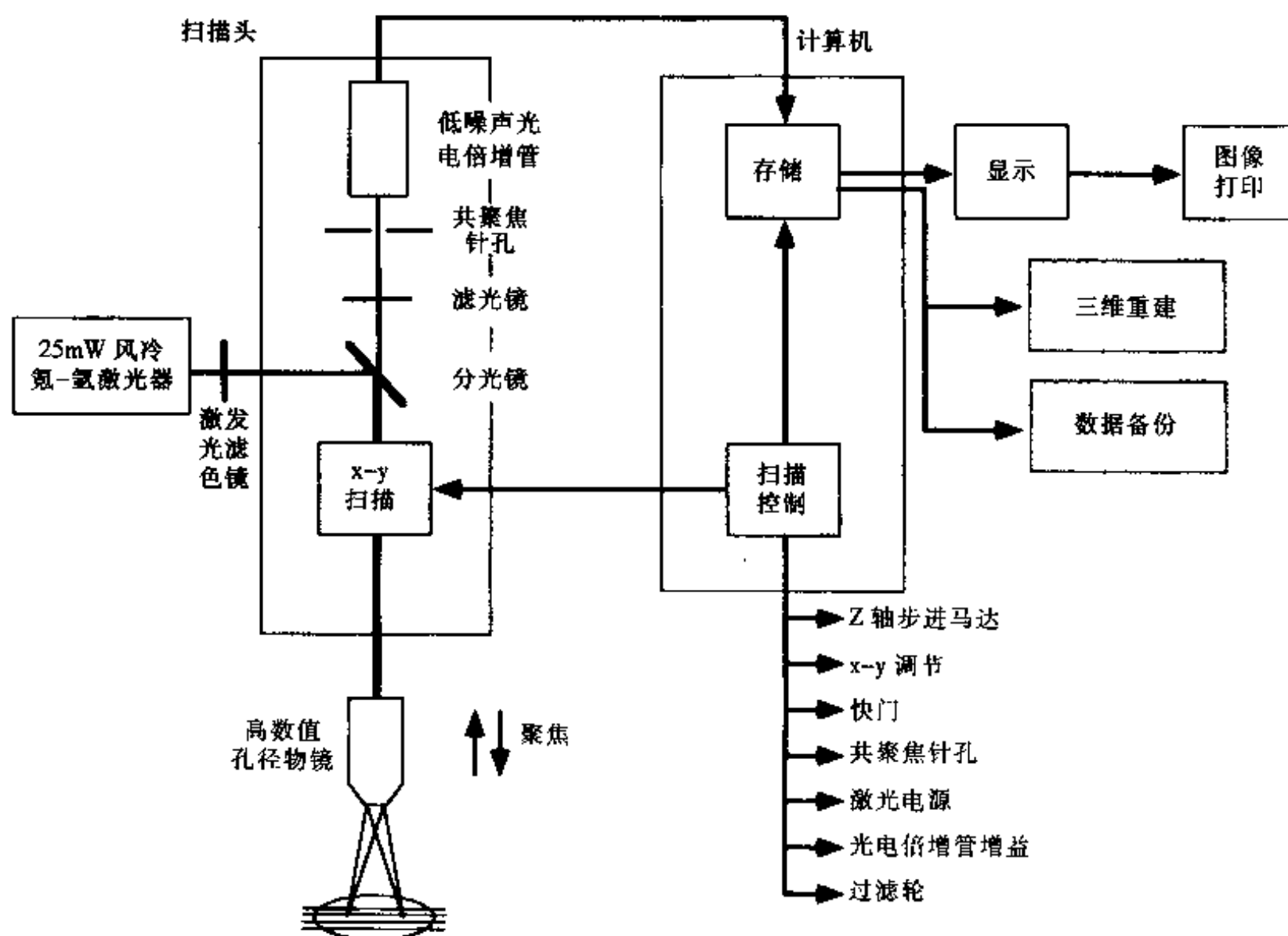


图 1-3 LSCM 原理图

胚胎细胞骨架的观察。光学切片的厚度可通过调节光探测器前面的针孔直径而轻易实现。这与另外一些采用固定直径针孔的其他设计相比,对于生物结构的观察更为灵活。图像可在不降低分辨率的情况下,通过简单地减少标本的观察区域而得到放大。这种方法可保证在使用一种物镜的情况下,使感兴趣的区域图像得到一定范围的放大,而避免了更换物镜时使感兴趣的区域丢失的缺点。

第一代 LSCM 对固定标本的成像效果较好,但对于样品的损伤大,因此活细胞或组织如不注意将造成死亡。在随后的发展过程中,仪器的各个成分不断得到改进,如:更稳定的激光、更有效的反射镜、更有效的光探测器、数字图像系统的改进等(图 1-3)。新的仪器更符合人类工程学原理,校准、滤光片组的选择、激光功率的改变都由软件控制,因此操作更容易。多达 3 种荧光标记可同时呈现,使用先进的软件和带有更大硬盘空间和更大随机存取存储器(RAM)的更快的计算机,使图像的采集和处理更为自由、容易。

三、共聚焦显微镜图像模式

(一) 单张光学切片

光学切片是共聚焦显微镜的基本图像单位。从固定和染色的标本以单波长、双波长、三波长或多波长模式采集数据(图 1-4)以数字方式进行储存。使用 LSCM 采集单幅光学切片的时间约为 1s,图像所占的存储空间与采集图像的大小和分辨率有关,如采集一幅 8 bit 的 768×512 像素的图像所占空间为 0.3Mb。

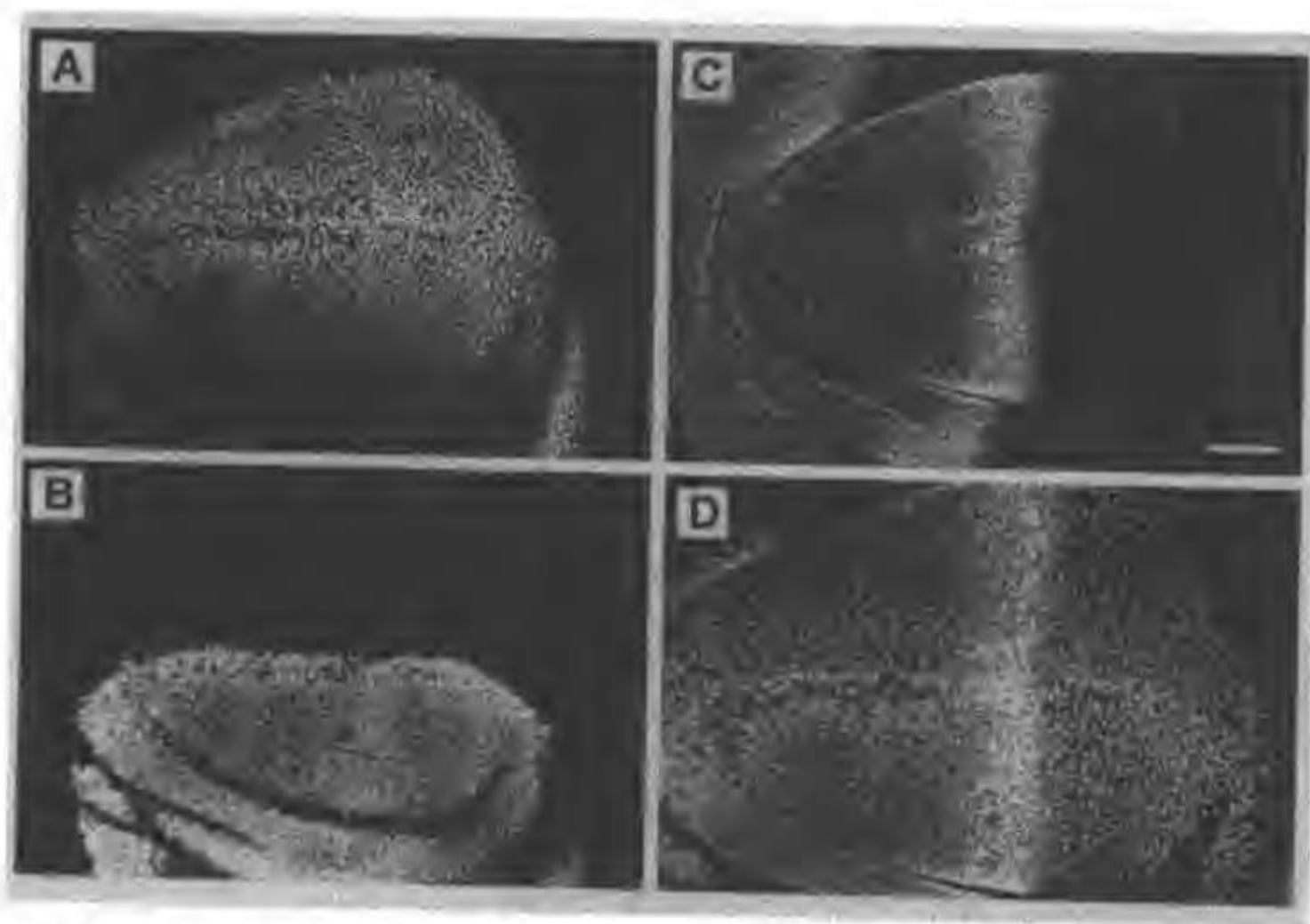


图 1-4 分别用氦氖激光器的三个单一波长 488nm、568nm、647nm 采集的果蝇第三期幼虫成虫板的单张光学切面。标记的三种基因为 vestigial (A: 荧光黄标记, 496nm); apterous (B: Lissamine 罗丹明标记, 572nm); CiD (C: Cy5 标记, 649nm); D 为前三张图像叠加形成的灰度图像

(二) 延时成像和活细胞成像

早期延时共聚焦成像采用高分辨率的 LSCM 研究活细胞(图 1-5),将定时器与照相机连接起来,使用 16mm 电影胶片;目前则采用延时 VCR、OMDR 和数码成像系统记录,使用 LSCM 设定的时间间隔采集一幅光学切片图像。

用 LSCM 进行活组织成像比对固定的组织成像更为困难 (表 1-1), 因为标本并不是总能耐受成像所需的苛刻条件, 如不能一直保持标本存活, 感兴趣的区域或结构无法靠近物镜, 或标本不适合镜台 (如在短工作距离的 LSCM, 大的培养皿无法放置在镜台上) 等。果蝇的翅成虫板在幼虫的深部发生, 如将其解剖后则无法在培养的条件下生长, 要研究这类组织中基因表达, 就需要在不同的发育阶段, 从不同的幼虫中解剖、固定和染色成虫板。

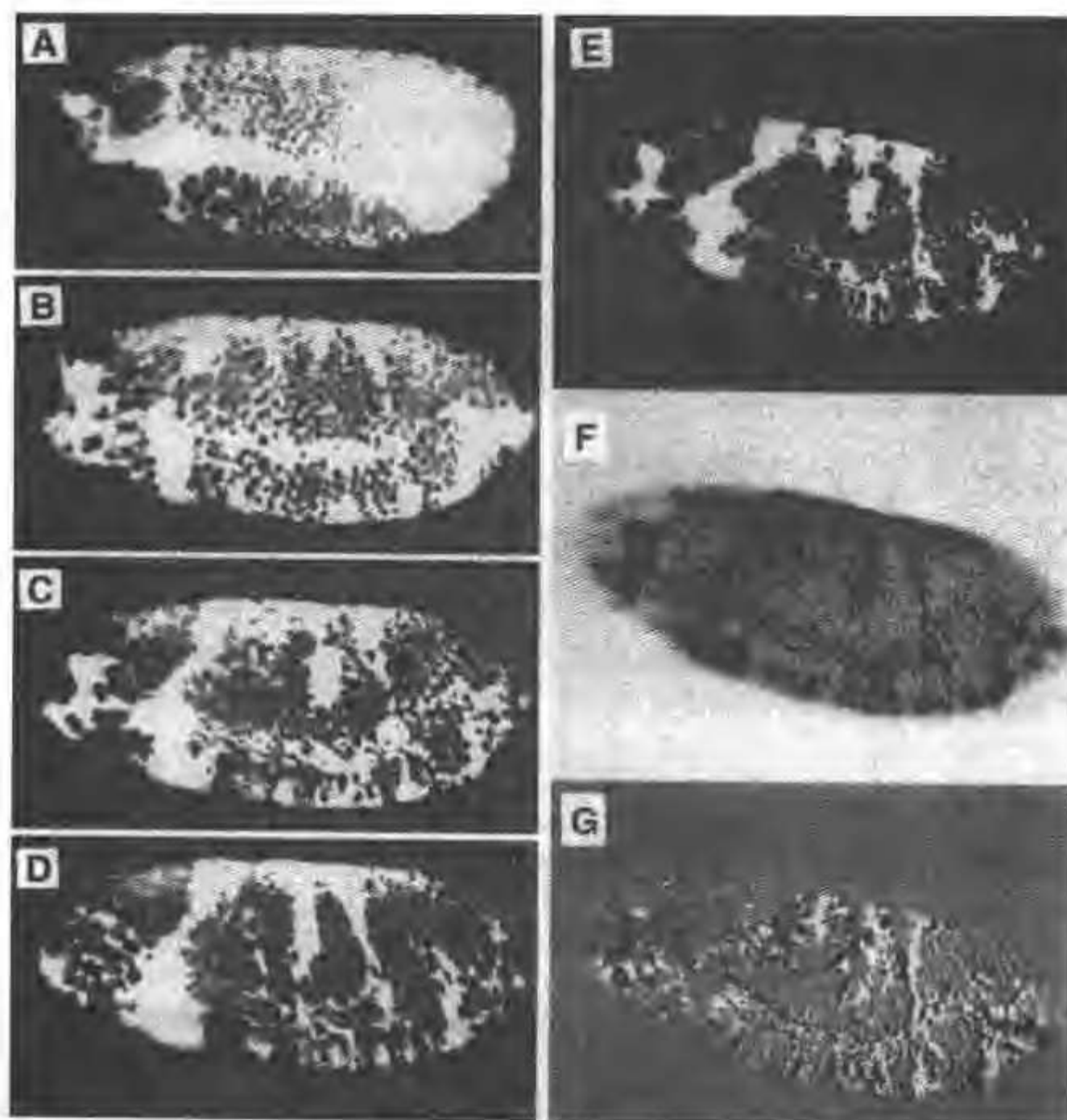


图 1-5 钙绿在果蝇胚胎的分布。A-D: 活果蝇胚胎用钙绿 (Calcium green) 注射后的延时成像; E: 在某一时间点采集的普通荧光图像; F: 在第二时间点采集的图 E 的反像; G: E、F 图像叠加后, 显示荧光探针的分布。同样的技术可用于进行不同时间点得到的不同颜色图像的叠加

表 1-1 对于固定细胞和活细胞使用 LSCM 的比较

	固定细胞	活细胞
照明	荧光团的光衰减	光毒性和染料的光衰减
抗衰减剂	苯二胺等	不可使用
封片剂	甘油 ($n=1.51$)	水 ($n=1.33$)
高 NA 物镜	1.4	1.2
每帧图像时间	无限制	受到生物学反应速度和标本对光敏感性的限制
信号平均值	可	无
分辨率	由波动光学决定	由光子统计学计算

注: n 表示折射率

活细胞成像要求在成像过程中始终保持镜台上细胞的存活, 应注意使用最小强度的激光, 因为激光束造成的光损伤在多次扫描时可以累加起来。抗氧化剂 (如维生素 C) 加入培养液可减少来自激发的荧光分子产生的氧, 因为氧可引起自由基形成并杀死细胞。对于一些荧光标记实验, 需评价光暴露对标本的影响, 一般应进行成像后组织活性的评估。胚胎在成像后应能继续进行正常发育, 如海胆胚胎在成像后应继续孵化。任何由图像采集过程或染料性质对标本产生的影响都应给予考虑。

每种细胞在生活时都有其特定的需要, 如大多数细胞需要镜台加热装置以保持适宜的温度, 有时还需要灌注室以保持培养液中 CO_2 浓度的恒定。而其他细胞, 如昆虫细胞需在室温下保持在大量培养液中。大部分共聚焦显微镜其光子产生效率已大大改善, 与更亮的物镜和更小光毒性的染料结合后, 在活细胞的共聚焦分析已不成问题, 但最好使用尽可能小的激光强度进行成像和尽快地采集图像。对于固定标本可增大针孔孔径以加快图像采集过程, 利用去卷积方法改进图像质量。

许多生理学过程的发生速度比大多数 LSCM 获取图像的速度快, 而大多数 LSCM 获取单帧图像的速度约为 1s。因此, 对于生理学图像的采集要求速度更快的 LSCM, 可使用声光装置和裂隙扫描标本, 而不是采用速度较慢的点扫描系统。这一设计的优点是具有良好的与时间分辨率相配的空间分辨率, 即每秒可达 30 帧全屏图像, 接近视频速度。另外使用点扫描 LSCM, 通过扫描一个大大缩小的区域也可获得良好的时间分辨率。

(三) Z 扫描和三维重建

Z 扫描是在标本的不同平面采集一系列图像 (图 1-6)。Z 扫描是通过显微镜细调节螺旋的移动完成的, 通常的方法是通过计算机控制的步进马达以预先设定的步距移动显微镜的镜台, 采用宏程序采集一幅图像, 以预设的距离移动焦距, 采集第二幅图像, 储存图像, 而后再移动焦距, 以这种方式进行图像采集和储存, 直到所有需要采集的图像都采集完成。常从 Z 扫描图像系列中选择 2~3 幅图像进行数字化叠加使得特定结构得到特异显示, 也可以很容易地将 Z 扫描图像以画面剪辑 (montage, 蒙太奇) 的方式进行显示 (图 1-6)。

Z 扫描图像可进一步处理成 3D 图像, 这一方法现在用来阐明 3D 结构和组织功能之间的关系, 因为要从 LSCM 的 200 张或更多的光学切片中看出复杂的互相连接的结构之间的关系非常困难。应注意用正



图 1-6 果蝇胚胎用 22C10 抗体 (主要是进行周围神经系统染色) 标记后采集的 Z 扫描系列图像的组合显示

确的步距采集图像，以反映标本的实际厚度。Z 扫描的图像以数字方式记录，因此很容易进行标本的 3D 重建（图 1-7）。

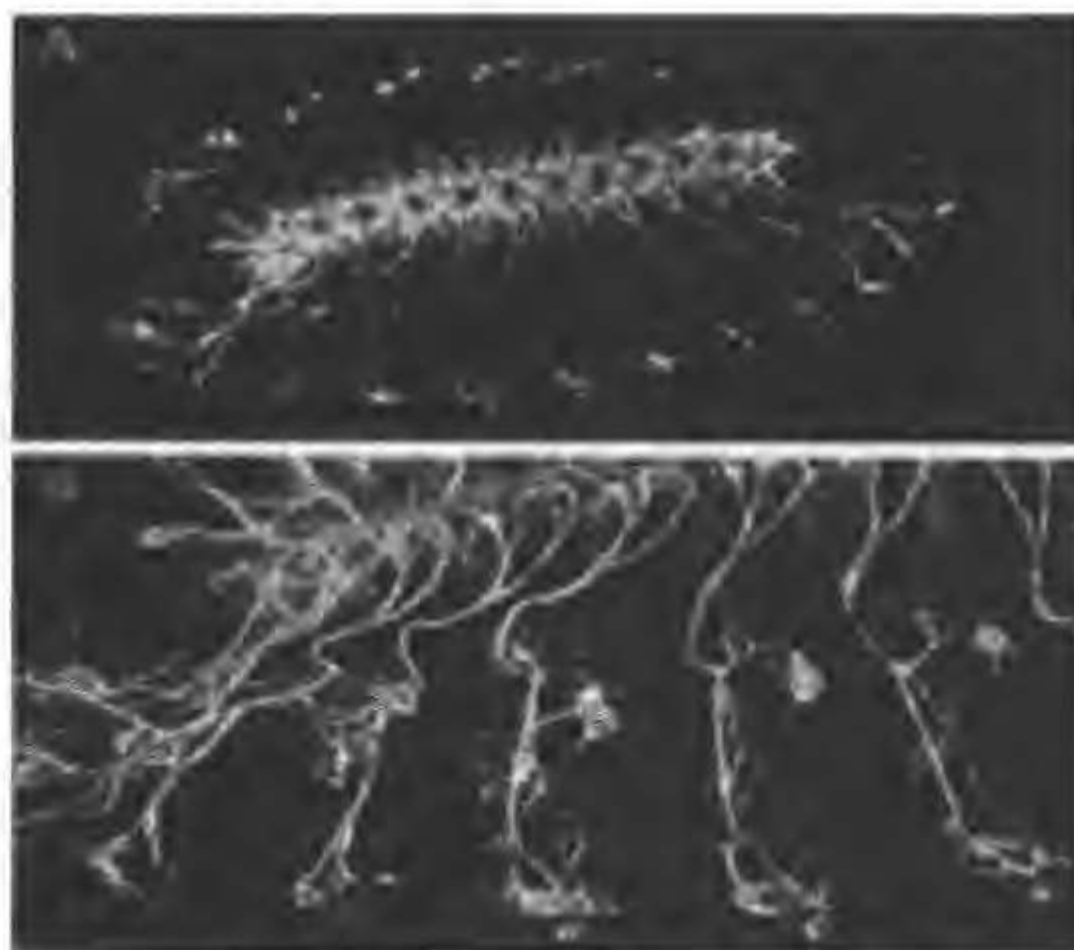


图 1-7 果蝇周围神经系统用 22C10 抗体染色后单层光学切面图像 (A) 与 Z 扫描三维重建后图像 (B) 的比较

光学切片的厚度通常是指用显微镜采集的标本切片的厚度，与物镜镜头和针孔直径有关，并不是指步进马达的步距，后者是由操作者设定的，一般情况下，两者值并不相等。但在特殊情况下，两者值可能相同。

Z 扫描的文件常被输出到计算机的 3D 重建程序。随着采用更快计算机芯片和更便宜的 RAM，在共聚焦显微镜的工作站进行 3D 重建将十分方便、有效。3D 软件包可产生单帧 3D 图像，也可以电影方式编辑来自标本不同视图的图像。3D 图像的特殊参数，如不透明性可交互改变以揭示标本内部不同层面的特定结构，也可进行长度、深度和体积的测量。

一系列延时摄影所得的图像，也可将时间设定为 Z 轴而处理成 3D 图像，可以观察发育过程中的生理学变化（如 Ca^{2+} ）。显示 3D 信息的一个简单方法是在不同的深度进行颜色编码光学切片（color coding optical section），可在标本内部的不同深度指定一种特定的颜色（如红、绿、蓝），采集一系列连续光学切片，而后再将这些彩色的 Z 扫描图像用图像处理软件如 photoshop 进行重叠和着色。

（四）四维图像

对于活体组织，用 LSCM 采集的 Z 扫描延时图像，可产生 4D 数据，即 3 个空间量纲（X、Y、Z）和 1 个时间量纲。这些图像可通过 4D 观看程序进行观察，可建立每一时间点的立体照片对，并作为电影观看，也可进行每一时间点的 3D 重建，以电影方式观看或进行画面剪辑。

（五）X-Z 图像模式

X-Z 模式可观察到标本的纵向结构（图 1-8），如表皮层的纵向切面。X-Z 模式的图像可在步进马达的控制下，通过不同的 Z 轴深度进行单线扫描而获得，也可通过在 Z 扫描图像的光学切片中使用 3D 重建程序的切割平面功能完成。但注意，在标本较厚时，组织内部的荧光标记可能不很清楚。

（六）反射光成像

未染色的标本也可通过 LSCM 以反射光模式进行观察，所有的早期共聚焦显微镜都采用这种方式进

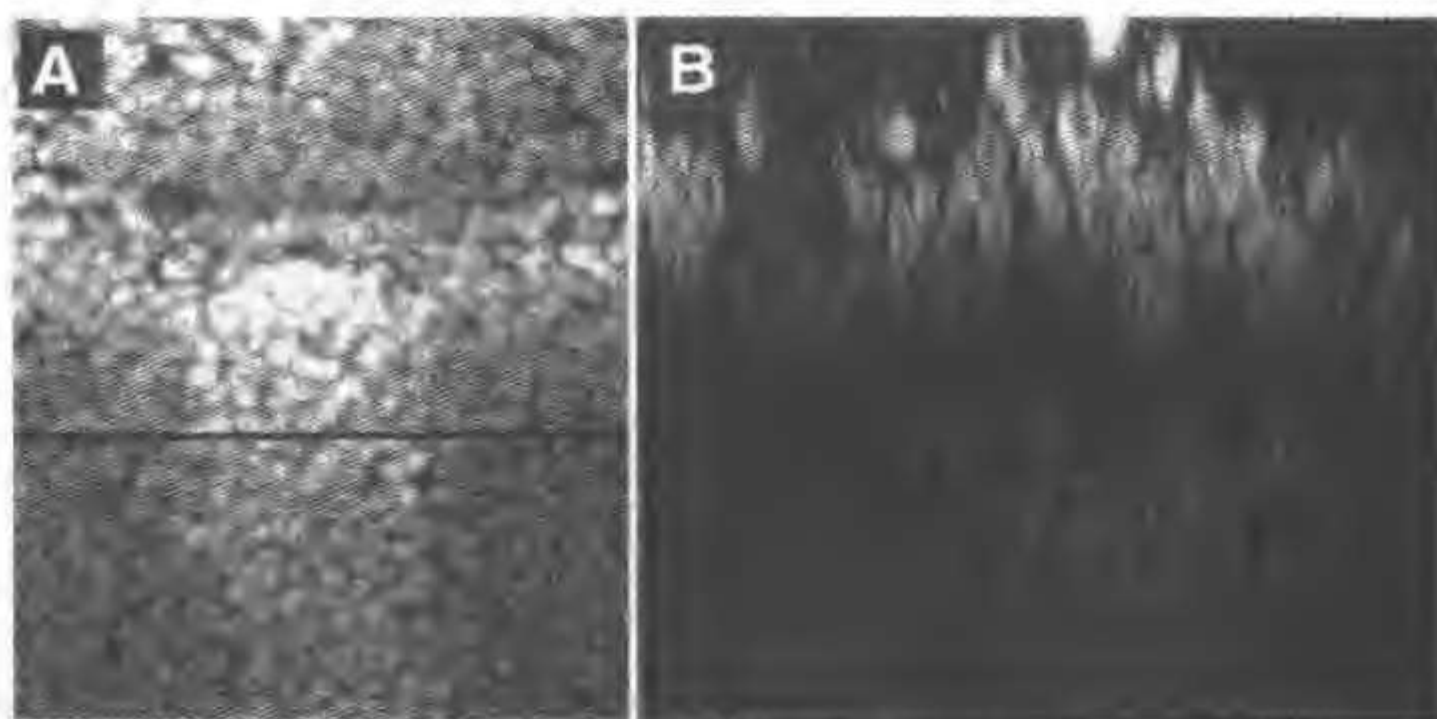


图 1-8 X-Z 成像。在同一样品的不同 Z 平面 (A 图中水平黑线标记部位) 的激光扫描位置的 X-Z 成像; B: 共聚焦成像系统得到的 X-Z 轴图像。注意蝴蝶翅膀上皮由两层上皮细胞层组成, 但由于标本深部的荧光强度较弱, 因此只有上层细胞能看清楚

行观察。另外, 标本可用反射光线的探针进行标记, 如免疫金或银颗粒。这种成像方法的优点是不存在光漂白问题, 尤其适合于对活体组织的观察。

(七) 透射光成像

任何形式的透射光显微镜成像 (包括相差、DIC、偏振光和暗视野), 都可采用透射光探测器进行采集 (图 1-9), 该探测器是 LSCM 上采集透射光的一种设备, 信号经光纤传递到扫描头的 1 个 PMT。因为共聚焦荧光图像和透射光图像使用同一束光同时采集, 图像记录保存后, 经数字方法将其结合后即可确定标记成分在组织内的精确定位。

采集标本的透射光和非共聚焦图像, 并将其与一种或多种标记物质的荧光图像进行叠加常可提供有

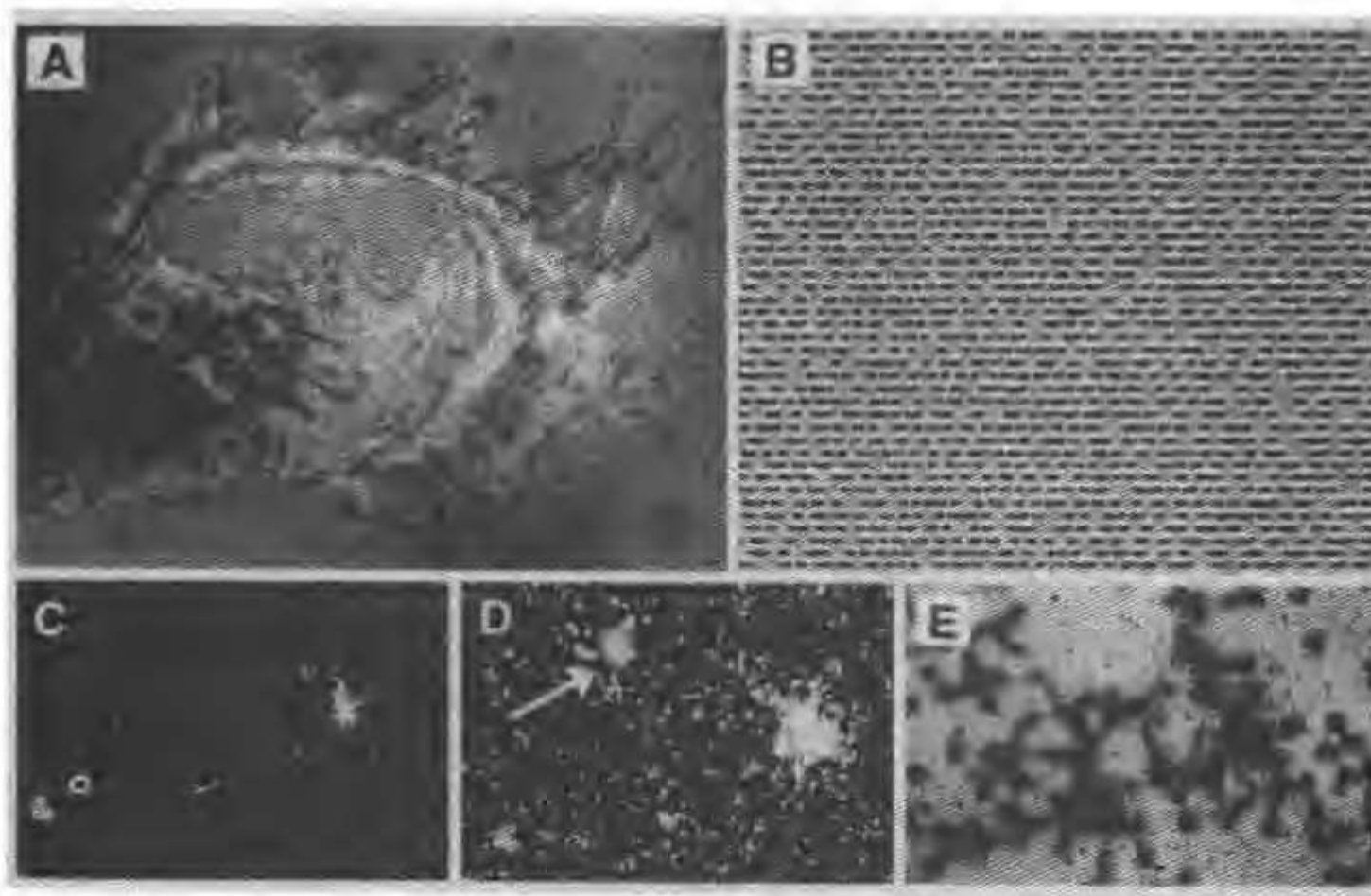


图 1-9 反射光 (A, B, C) 和透射光 (D, E) 图像。A: LSCM 反射光检查显示细胞与细胞周围组织接触面为黑色; B: 音频 CD 的表面结构共聚焦检查; C-E: HIV 感染血细胞的原位杂交结果。在共聚焦反射光模式 (C)、透射光暗视野 (D)、明视野 (E) 条件下银颗粒很容易看到。注意灰尘颗粒造成的假阳性 (图 D 中箭头部位) 在共聚焦光学切面不存在

用的信息。可用于在较长时间内（几小时或几年），监测标记的细胞亚群在未标记细胞群中的时间和空间迁移情况。现在已经出现实时彩色透射光探测器，可采集红、绿、蓝通道的透射光信号并生成实时彩色图像，采用与某些彩色数码相机相似的方式进行图像采集。这一设备对于病理学工作者尤为适用，他们习惯于用透射光观察彩色图像，同时可将观察到的图像与荧光图像重叠。

（八）与相关显微镜的联合应用

关联显微镜或整体显微镜的前提是用一种以上的显微镜技术从标本的同一区域采集信息，如 LSCM 可与透射电子显微镜（transmission electron microscope, TEM）同时应用，可在固定的组织同时观察 W-P 小体在血管内皮细胞的分布；也可先用伊红作为荧光标记，在 LSCM 下观察细胞内微管的分布，而后在电镜下观察则表现为电子致密标志物。另外，扫描电子显微镜（scanning electron microscope, SEM）和反射光成像也可与 TEM 联合应用。近期我们成功地将同一个样本采用不同的处理程序，应用于 TEM、SEM、LSCM，镜下观察，避免了样本间的误差，取得了良好的观察结果（彩图 5、彩图 6）。

第二节 标本制备和图像采集

许多用于共聚焦显微镜的实验技术方法，多以普通光学显微镜为基础，必要时进行改进以适合共聚焦显微镜的需要。对于普通显微镜，主要方法是降低焦点以外的荧光干扰。与普通光学显微镜相比，共聚焦显微镜可进行厚标本深部的荧光观察，对标本的染色要求染色的时间较长或荧光探针的浓度较高，这对子普通光学显微镜可能造成染色过度，而无法分辨其细节。

典型的 LSCM 系统，尽管每秒扫描多点，但其扫描强度大，亮度高。通常每点扫描时间为 $1.6\mu\text{s}$ ，对于每点的平均照明强度相对处于中等水平，比普通荧光显微镜低，对组织损伤小。许多实验技术使用了抗光漂白剂，可防止激光光束对荧光团的光漂白作用。为防止激光对荧光探针的光漂白作用，尽可能使用最低强度的激光，现代的高水平 LSCM，可以不使用抗光漂白剂。

LSCM 的应用，使得较厚切片的图像质量得到较大的改善。标本必须完全地适合显微镜的镜台，要观察的区域应当在显微镜镜头的工作距离之内。如高分辨率的 $60\times$ ，NA（数值孔径）1.4 的物镜其工作距离为 $170\mu\text{m}$ ；而 $20\times$ ，NA 0.75 的物镜其工作距离可达 $660\mu\text{m}$ 。为观察合适的区域，有时必须以损失分辨率为代价，否则，使用不适当的镜头，可能造成标本被压碎或损伤。

透光性和浑浊度可影响激光束的穿透深度，未固定和未染色的眼角膜上皮相当透明，激光束可穿透深达 $200\mu\text{m}$ 左右；而对于未固定的皮肤组织，其穿透深度仅约为 $10\mu\text{m}$ ，因为它透明度很差，光散射多。组织的作用就像中密度滤光片，可减弱激光束。在固定过程中加入某些透明剂可增加组织的透明度。

激光能穿透较厚的标本这一问题解决后，可用普通切片机切出较厚的切片，也可用振动切片机制备活体脑组织切片，在 LSCM 下，可获得良好的标记效果。为了观察标本深部也可将标本从切片取下，使其颠倒后再贴到切片上进行观察，从两个方向观察标本。也可用长波长激发的荧光染料，如 Cy5 来标记标本较深部位的物质，而不用短波长激发的荧光染料标记。与短波长荧光染料标记的图像相比，其分辨率略有降低，但却获得了较强的穿透力。多光子 LSCM，因为采用了红光作为激发光，则有利于从标本的深部采集图像。

一、物镜

在共聚焦显微镜对标本的观察中，物镜的选择尤其重要，透镜的 NA 反映了透镜的光采集能力，它与光学切片的厚度和最终分辨率有关。一般说来，NA 越大，光学切片越薄。对于 $60\times$ ，NA 1.4 的镜头，当针孔设定为 1mm （关闭状态）时，其光学切片厚度为 $0.4\mu\text{m}$ ；而 $16\times$ ，NA 0.5 的物镜，当针孔设定为 1mm 时，其光学切片厚度约为 1.8mm 。打开针孔（增加针孔的直径）将进一步增加光学切片的厚度（表

1-2)。这些数值是由 Bio-Rad MRC-600 LSCM 测得的, 其垂直分辨率与侧向分辨率一样好。如 60 \times , NA 1.4 的物镜水平分辨率约为 0.2 μm , 垂直分辨率约为 0.5 μm 。当用不同的波长进行多标记标本的图像采集时, 可能产生色差。视场的平整度 (flatness) 是选择物镜时另外要考虑的因素。

通常 NA 越大的透镜, 其分辨率越高, 价格也越昂贵, 在标本的扫描区域和最大分辨率之间常要作出均衡考虑 (表 1-3), 如进行果蝇胚胎的图像采集时, 4 \times 镜头可用来定位切片上的成虫板; 16 \times , NA 0.5 的物镜用来进行果蝇全胚成像; 而用 40 \times ; NA 1.2 或 60 \times , NA 1.2 的物镜分辨胚胎或成虫板内单个细胞核。对于大组织, 如蝴蝶成虫板, 用 4 \times 的物镜观察翼板, 用 40 \times 或 60 \times 的物镜可达到分辨细胞的水平 (图 1-10)。某些使用自动 X-Y 镜台的显微镜具有在高分辨率时观察到较大视野的能力, 其镜台围绕标本移动。而且可进行图像采集和编辑, 也可通过手工方式进行编辑并以数字方式粘贴在一起。

表 1-3 中物镜 1 更适合高分辨率固定细胞的成像, 而物镜 2 较适合用 UV 染料染色的活组织图像采集。

表 1-2 使用 Bio-Rad MRC600 LSCM 时不同物镜的光学切片的厚度 (μm)

物 镜		针 孔	
放大倍数	NA	关闭 (1mm)	打开 (7mm)
60 \times	1.40	0.4	1.9
40 \times	1.30	0.6	3.3
40 \times	0.55	1.4	4.3
25 \times	0.80	1.4	7.8
4 \times	0.20	20.0	100.0

表 1-3 共聚焦显微镜物镜的重要特性 (物镜的选择)

特性	物镜 1	物镜 2
设计	平面-复消色差物镜 (plan-apochromat)	CF-fluor DL
放大倍数	60	20
NA	1.4	0.75
盖玻片厚度	170 μm	170 μm
工作距离	170 μm	660 μm
镜筒长度	160 μm	160 μm
介质	油	干
色彩校正	最好	好
视场平整度	最好	中等
UV 透照 (transmission)	无	优良

大多数 LSCM 的一种非常有用的特性是可以使用同一物镜, 在不损失分辨率的情况下具备缩放 (zoom) 图像的能力。通过控制扫描反射镜来缩小标本的被扫描范围, 并将扫描的信息输入帧存储 (framestore) 或计算机内存即可完成。在不移动标本的情况下, 可用同一物镜得到不同放大倍数的图像 (图 1-10)。为获得较好的分辨率, 一般应考虑使用 NA 较大的物镜, 而不是用 NA 较小的物镜成像后再用计算机进行无限制的放大。

许多 LSCM 具备一个可调节的针孔, 有时为采集到标本内更详尽的细节将针孔打开, 可以观察较厚的切片, 这样可使更多的光被光探测器接收但却使分辨率降低。当针孔关闭时, 切片的厚度和光亮度降

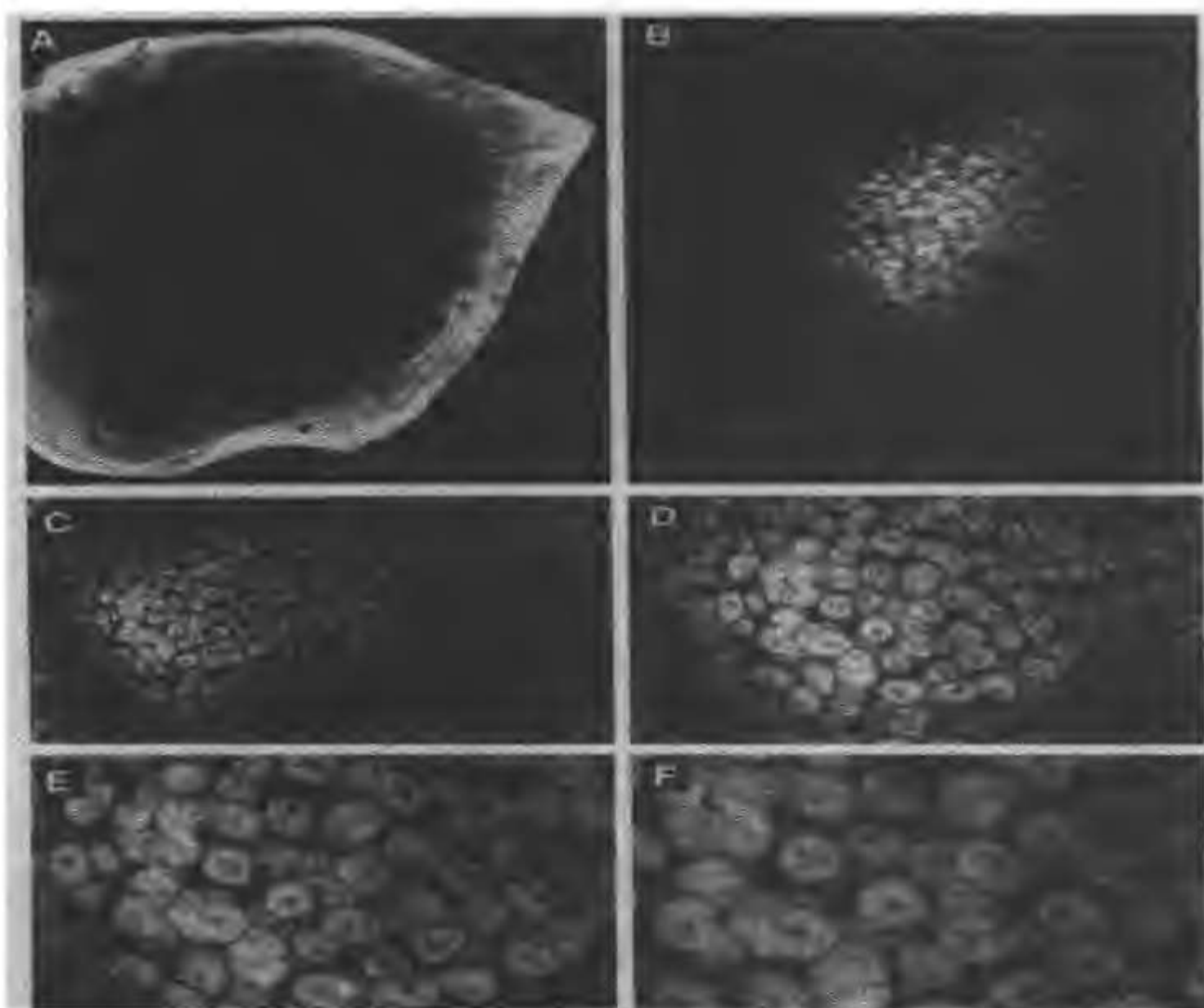


图 1-10 使用不同物镜及同一物镜不同的 zoom 值得到的图像。A: 4×物镜观察第五期幼虫成虫板的全貌; B: 16×物镜可给出更清晰的核染色细节; C: 40×物镜核染色细节更清晰; D-F: 为 40×物镜 zoom 值逐渐增大后的图像

低, 而可使分辨率提高, 但分辨率增加到一定的针孔直径时, 即使亮度继续减弱, 分辨率也不再增加, 不同的物镜其数值不同。

二、荧光探针

用于改进免疫荧光定位的新荧光探针的合成影响着共聚焦仪器的发展, 其激发和发射光谱与大多数 LSCM 提供的激光波长相匹配的荧光染料已经使用多年 (表 1-4)。改进的与抗体交联的荧光探针仍继续不断出现, 如花青染料 Cy3 取代罗丹明, 其荧光强度更亮, Cy5 用于三标染色效果良好。

荧光原位杂交 (FISH) 是显示荧光标记的 DNA 和 RNA 序列在细胞内分布的一种重要方法。此外, 用 LSCM 来显示细胞核和分离的染色体总 DNA 的更亮的荧光探针, 现在也可得到, 例如二聚核酸染料 TOTO-1 和 YOYO-1。而一些荧光染料如 Hoechst 33342 和 DAPI (4,6-二氨基-2-苯基吡啶) 等, 因为其激发波长太短, 与大多数 LSCM 提供的激光和反射镜不匹配, 无法满足需要。但这些染料可采用 HeNe 激光或 UV 系统激发, 用多光子显微镜也可进行图像采集。多光子技术不需要特定的 UV 反射镜和透镜, 因为它使用红光作为激发光, 用脉冲钛蓝宝石激光进行照明。

目前可得到许多可对细胞内细胞器和结构进行特异性染色的荧光探针, 而且标记的过程非常简单容易。这些荧光探针包括许多标记细胞核、线粒体、高尔基体和内质网的染料, 也有可标记细胞内多聚肌动蛋白的荧光标记次毒蕈环肽。次毒蕈环肽可用于显示发育组织的细胞外形, 周围的肌动蛋白网则标记为明亮的环 (图 1-11)。这些染料在确定特异性抗原在特定细胞器的定位及其关系时相当有用, 可进行抗原和亚细胞结构的多标记研究, 如可将次毒蕈环肽、细胞核染料和要显示的抗原进行三标 (图 1-11)。也可用来研究细胞内已知蛋白的分布和功能, 如微管蛋白等。当进行活细胞成像时, 最重要的是要注意

表 1-4 某些常用荧光探针和核染料染料的激发和发射波长峰值

染料	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)
FITC	496	518
Bodipy	503	511
CY3	554	568
四甲基罗丹明	554	576
丽丝胺罗丹明	572	590
CY3.5	581	588
Texas Red	592	610
CY5	652	672
CY5.5	682	703
Hoechst 33342	346	460
DAPI	359	461
吖啶橙	502	526
PI (碘化丙啶)	536	617
TOTO3	642	661

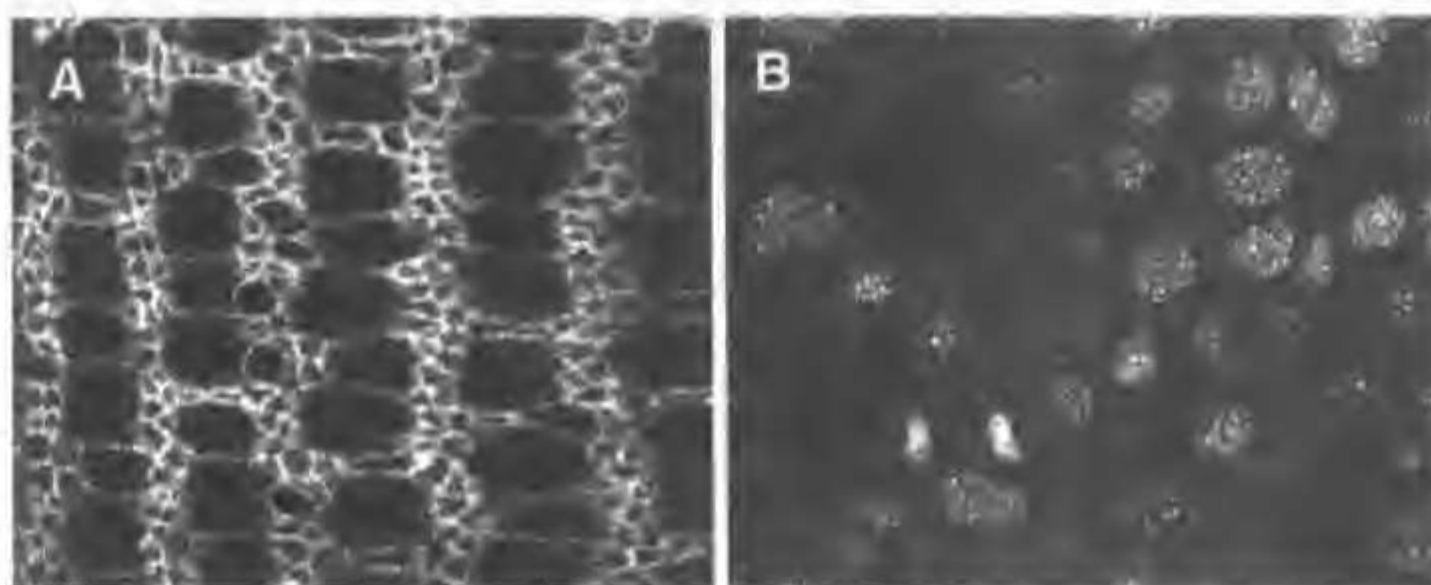


图 1-11 用染料标记后的细胞图像。A: 次毒蕈环肽标记细胞轮廓; B: ToPro 标记细胞核。两个标本都是蝴蝶 PUPAL 翼成虫板整装片样品

加入的荧光探针对实验系统的影响。某些荧光探针可能对活细胞有毒性,尤其是在激光激发的条件下,在培养液中加入维生素 C 可减低毒性作用。在进行图像采集时,标记的细胞成分也影响细胞活性,细胞核染料比胞浆染料对细胞的损伤更重。现已有区别活细胞和死细胞的荧光探针,并可用来评价细胞的存活状况。这些方法的原理大多数是根据死细胞的细胞膜可使某些荧光染料透过,而这些荧光染料则无法通过活细胞的细胞膜,这类染料包括吖啶橙以及分子探针公司的许多测定细胞存活性的试剂盒。

许多合成的荧光染料,如 Fluo-3 和 rhod-2 在离子(如 Ca^{2+})存在时,其荧光特性发生改变。许多用于显示基因表达的新荧光探针已经出现,如水母绿色荧光蛋白(GFP)可用于在体内观察基因表达和蛋白定位。GFP 已经用于监测多种不同类型细胞的基因表达,包括果蝇卵细胞、哺乳类动物细胞和植物细胞,可用 LSCM 488nm 的激光进行激发。已经有用于多标记研究的 GFP 谱系突变体(spectral mutants),用于防止活组织的自发荧光。

三、自发荧光

当时组织进行图像采集时,自发荧光可能是背底增加的一个主要原因。自然情况下,多种细胞可产

生自发荧光。在酵母菌细胞和植物细胞，可看到红色的叶绿素荧光。另外，某些试剂，尤其是戊二醛固定剂可能是自发荧光的来源，但经氢硼化物处理后，其自发荧光可降低或消除。使用超出自发荧光激发光波长范围的激发光可消除自发荧光。为避免短波长自发荧光的干扰，常选用 Cy5 的长波长进行激发。通过使用不同波长的激光激发未染色的标本，可评估标本自发荧光的量。注意设定 PMT 的增益和背底水平 (black level) 以及激光的功率 (图 1-12)。自发荧光可通过高强度激光快闪作用 (quick flash) 进行光漂白，将标本完全暴露于水银灯的光照中也有同样效果。更复杂的处理自发荧光的方法是进行时间分辨荧光成像 (time resolved fluorescence imaging)。自发荧光也可通过图像提取技术 (image subtraction) 加以减除。尽管自发荧光在进行图像采集时常常会带来问题，但在进行多标记显示时，也可利用组织的自发荧光来显示完整的细胞形态。

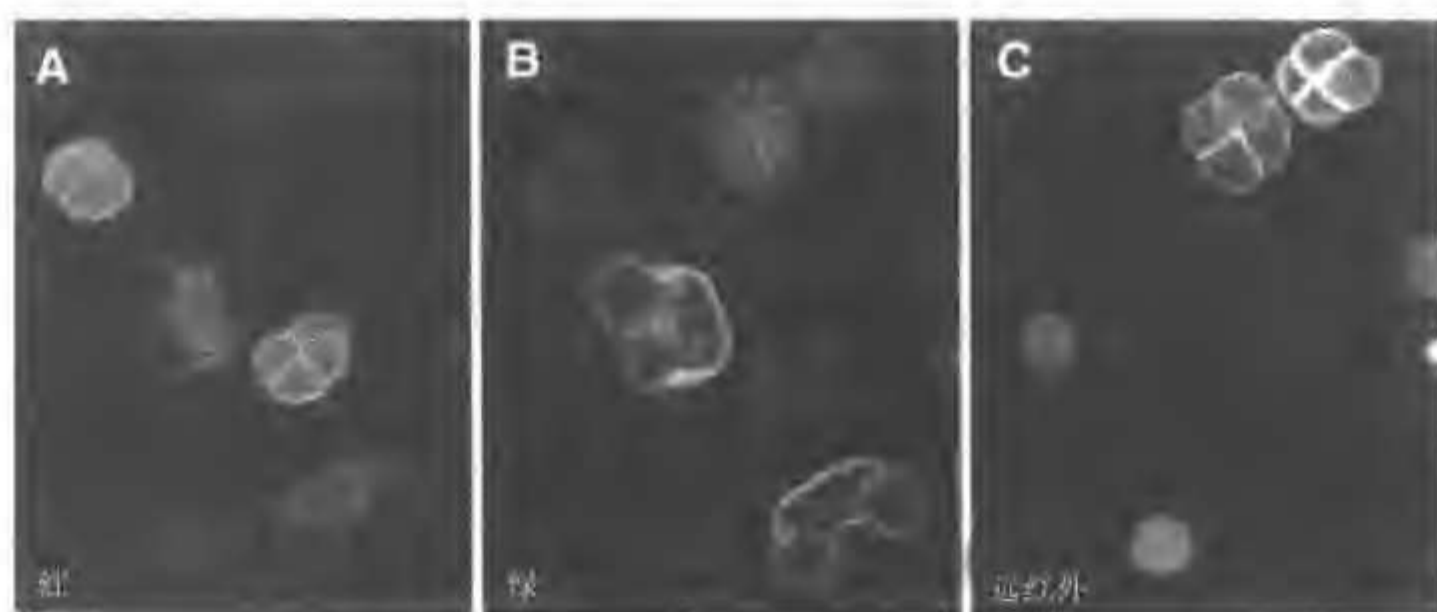


图 1-12 组织自发荧光举例。注意在不同激发波长有不同类型的花粉荧光，这些图像在增益设定、背底水平和针孔大小相同的条件下进行采集

四、图像采集

初学者可从不同的渠道获得共聚焦成像的知识，LSCM 附带的操作手册包括一些最基本的仪器使用方法。但负责操作仪器的人一般应进行短期的定向培训，对于多用户使用的仪器，在独立操作前，管理人员应对其进行短期培训并确保能胜任相应的图像采集工作。初学者尤其要注意相应的操作规程。其他有用的信息来源包括共聚焦显微镜公司的培训课程、光学显微镜的专题研讨会及出版物等。

进行图像采集前，先要熟悉仪器的基本操作。对于初学者，建议使用容易标记的标本进行图像采集，而不使用难以标记或结果不确定的标本。一些好的测试样品如吸收了一种或多种荧光染料的纸或制备好的荧光珠 (beads)，它们都是较为明亮的，容易进行共聚焦成像的标本。一种尤其有用的标本是不同花粉混合的玻璃片，在多种不同波长的光线激发时，可产生自发荧光 (图 1-12)。这种玻片可以买到，如 Carolina Biological，也可通过采集不同植物的花粉自行制备。往往这些标本都有某些特定的表面结构，并且在激光束的照射下保持良好。对于活体研究相当可靠的测试标本是洋葱表皮或某些水生植物 (*Elodea sp.*)，可自发荧光或用 DiOC₆ 染色。

仪器在使用前都应进行校正，不同的仪器，其校正方法不同，一般应由负责仪器的管理人员进行，其他人员未经许可，不得尝试进行校正，最好由仪器公司的技术人员完成。

对仪器不仅要进行定期的维护和保养，而且应注意一些光学显微镜使用的基本常识。所有的玻璃和镜头表面都应进行清洁，因为盖玻片和物镜上的灰尘和油脂常常是图像质量不佳的主要原因。标本的封片也应注意，盖玻片的厚度应在物镜的工作距离以内。透镜和标本之间的折光率应正确匹配，如某些特定 NA 的物镜使用正确的镜油，对于特定的物镜使用适当厚度的盖玻片，尤其在高倍物镜时更应注意，盖玻片应与载玻片有一定程度的密封，并保持平整。对于固定的标本可用指甲油，但在进行图像采集

前,应保证其干燥。对于活组织,可使用某些无毒性的密封剂,如凡士林、蜂蜡(俗称黄蜡)和羊毛脂效果都不错。

对于要观察的区域,应先用明视场显微镜和普通荧光显微镜进行定位,当然也可使用共聚焦系统的显微镜进行定位。但对于大多数初学者或非专业研究人员来说,在只使用共聚焦模式的情况下,常很难找到合适的焦平面。所以应该学会使用共聚焦系统配备的显微镜,以常规模式预观察样品,因为要在一张含有数百个胚胎的标本中找出特定发育时期的某种基因的表达非常困难,如直接采用共聚焦模式扫描标本,常很费时。许多仪器具备快速扫描功能,可在一定程度上弥补这种缺陷,但在快扫模式下,其分辨率较低。因此,当寻找少见的现象时,较容易的方法是使用普通模式观察切片,一旦发现即刻切换到共聚焦模式进行图像采集。

成功进行共聚焦图像采集的关键是掌握透镜 NA、针孔大小和图像亮度之间的互相配合,对于亮度,应以可获得最佳图像的最小激光强度为标准,即在保证成像的情况下,激光功率尽可能小。可使用软件的放大功能(zoom)放大图像,并将所得的图像与高 NA 物镜所得的图像进行比较。在显微镜特定成像参数的设定操作时,应在标本要观察的特定区域以外进行,防止有价值的区域发生光漂白。常包括设定 PMT 探测器的增益和背底水平,以及合适的针孔大小,保证在可接受的分辨率和足够的反差之间获得平衡,使用最低的激光功率以避免发生过多的光漂白。许多仪器具有颜色表(color table),有助于设定图像中的正确动态范围。在 8 比特系统中,该表将最黑的像素设定为 0,为伪彩绿色,而最亮的像素设定为 255,为伪彩红色。增益和背底水平以及针孔的调节,使其变化范围在 0~255 之间,这种调节也可通过肉眼进行。但在进行实际图像采集时,标本的荧光不均匀,可能超出此范围,因此,亮的区域可能遮盖暗的区域。

采集的图像常储存在计算机的硬盘中,而后再进行拷贝。通常在图像采集过程中,应采集尽可能多的图像,如果需要删除,可在随后的图像处理过程中删除不满意的图像。有时开始看似不满意的图像,在日后的进一步复审中可能变得价值非凡,因此,在进行图像删除时,应慎之又慎!要与以前制备标本时各项条件保持一致,再重复制备标本非常困难,有时是不可能的。

五、故障排除

有时某些实验过程可能不明原因的无法得出满意结果。此时,一个很好的试验方法是用普通荧光显微镜检查标本,如果在普通荧光显微镜下肉眼可看到荧光,则在共聚焦系统,其荧光信号应很亮。如果在共聚焦系统看不到图像,一方面要检查使用的荧光探针与仪器的激发波长是否匹配,另一方面应使用已知的测试样本全部检查共聚焦系统各部分。图像的数字文件应适当编号,并为具体的实验者所专用。尤其是在进行图像命名时尽量少用姓氏作为文件名,这样很容易引起混乱和重复。而且每幅图像应详细记录各种采集参数,包括激光功率、增益、背底水平、针孔直径、zoom 值和使用的物镜。

如在使用中遇到问题,建议向有使用经验的专家寻求帮助。假如仍无法解决,可从购买共聚焦显微镜的公司寻求解决办法,可通过本章后面所列出的公司网址进行访问以获得解答。

实验本身的问题常常是由试剂的降解引起的,应进行一系列的诊断测试。实验使用的试剂最好自己亲自新鲜配制。抗体应等分为小份后分别储存。许多试剂可以重复使用,而且一般并不影响实验结果,尤其对于昂贵的试剂和稀有的试剂更应注意节约和尽量重复使用。

在多标记实验中,可能发生一个通道向另一个通道的荧光渗透(bleedthrough),这可能是标本本身的性质引起的,也可能是仪器的问题造成的。荧光渗透的原因和矫正可参阅相应的文献综述。仪器测试的一种好的方法是用一种已知有荧光渗透的标本,使用多标记设定和单标记设定进行检测。采集测试标本的图像,并记录图像采集的各种参数(激光功率、增益、黑面水平、针孔直径),以便在发生问题时,再以相应的条件采集测试标本的图像,并与以前储存的图像比较,确定仪器的操作是否适当。

另外的测试包括激光颜色的视觉检验和激光的阳极电压。如果氩/氦激光的光线在多标记模式进行

扫描时,看起来是蓝色而不是白色,提示红色线较弱,这种情况下,激光管的阳极电压通常较高,可通过调节激光管的反射镜使其降到可接受的水平,应由专业人员进行,如果无法将电压降到合适水平,则应考虑更换新的激光管。

有时实验失败可能是由于抗体降解引起的。陈旧的标本可造成背底荧光的增加,从标记的第二抗体分离出来的荧光色素和弥散到组织中的荧光色素,可以引起荧光渗透。在尽可能的情况下,应使用新鲜制备的标本观察。有时,改变荧光探针的浓度和(或)分布也对获得理想的实验结果大有帮助。如荧光黄渗透到罗丹明通道,可将荧光团调换使罗丹明位于较强的通道,因为荧光黄的激发光谱有一个尾部位于罗丹明的激发波长内。如荧光强度太强,还可在随后的实验中降低第二抗体的浓度。

六、图像处理和出版

共聚焦图像通常采集为数字计算机文件,常利用共聚焦系统提供的软件进行操作。LSCM 最显著的改进之一是共聚焦图像的显示,这部分的改进相当重要,因为尽管 LSCM 可获得良好的分辨率,如不能进行显示和进行复制,则分辨率的改进也没有太大价值。现在仍有大多数实验室采用暗室和化学药剂完成硬拷贝。彩色图像的复制更为困难,因为照片冲印人员大多不具备冲印专业照片的色彩平衡知识,无法获得正确的色彩还原。较为理想的方法是将图像输出到幻灯片制作系统、彩色打印机或热升华打印机,这样可制作出高质量的出版图片。照片可从视频显示器直接拍摄,甚至可以制作成多媒体在互联网上发布。

由于图像出版质量的不断提高,许多杂志接受数字图像投稿,这意味着共聚焦成像系统获得的高分辨率图像,在最终的出版物中得到更为真实的复制。某些杂志也以 CD ROM 形式出版文章,所出版的图像将与共聚焦显微镜采集的图像完全相同。这些技术的进步对彩色图像尤为有用,其分辨率和色彩平衡可被杂志精确复制,从理论上讲,作者将减少出版所需的花费。

第三节 相关资讯

(一) 一些较好的通用网站

www.videomicroscopy.com 极好的视频和数字图像杂志,与许多涉及共聚焦技术和图像技术网址链接,有良好的基础教程和仪器操作资料。

www.ou.edu/research/electron/mirror/web-org.htm 以机构名称列出的显微镜网址目录。

www.patents.ibm.com IBM 专利 Web 服务商,是一个有用的专利数据库,包括那些涉及共聚焦成像的专利,全部专利包括图表都可通过服务商访问。

www.bocklabs.wisc.edu/imr/home2.htm 共聚焦、双光子和四维图像基本原理的有用网址,列出 Madison 公司仪器有关的会议、专题讨论会和书籍出版的预定时间。

(二) 共聚焦显微镜公司

www.microscopy.bio-rad.com Bio-Rad 显微镜:关于他们的激光扫描、实时和双光子系统的资料,许多有用的应用注意事项可以下载,此处可访问论文数据库。

www.leica.com 有关光学显微镜包括共聚焦系统的详细资料,共聚焦成像教程。

www.nikon.com 显微镜产品和技术信息。

www.noran.com Noran 仪器:实时扫描系统和图像分析软件的详细资料。

www.olympus.co.jp 介绍其显微镜和共聚焦成像系统。

www.lasertec.co.jp 激光技术公司网址。

www.optiscan.com.au Optiscan 网址。

www.technical.com 技术仪器 (Technical Instruments) 网址。

www.lsr.co.uk 生命科学资源 (Life Science Resources) 网址。

www.mdyn.com 分子动力学 (Molecular Dynamics) 网址, 可找到很好的应用体会和注意事项。

www.zeiss.com 美国 Carl Zeiss 公司网址, 介绍光学显微镜的详细资料, 包括实时和激光扫描系统。

(三) 滤光片

www.chroma.com 提供有用的光学滤光片手册。

www.omegafilters.com

www.imagel.com

(四) 染料

www.jacksonimmuno.com 荧光探针和抗体。

www.probes.com 分子探针公司 (Molecular Probes) 网址, 可查到成像使用的大多数荧光探针的详细资料。

(五) 共聚焦显微镜方法学

www.bioimage.org 3D 显微镜的详细资料。

www2.uchc.edu/hutterasaki 活细胞成像。

(六) 课程和相关学术机构

www.mbl.edu Woods Hole 的 Marine 生物学实验室, 提供光学显微镜包括共聚焦成像的相关课程, 在同一地方可看到多种共聚焦显微镜。

www.cshl.org Cold Spring Harbor Laboratory 网页。

www.msa.microscopy.com 美国显微镜协会网址, 包含其他网址和显微镜协会的有关链接, 关于该协会年会和涉及各种显微镜 (包括共聚焦显微镜) 的其他会议的详细资料。

www.rms.org.uk 英国皇家显微镜协会网址, 提供对 Journal of Microscopy 的链接。

(七) 专业咨询和讨论

最有用的共聚焦资源之一是 Robert Summers 开始的建立于 SUNY Buffalo 的共聚焦 e-mail 团体。共聚焦邮寄名单服务 (listserver) 几年前由 Bio-Rad 公司创立, 作为其用户的讨论团体, 现在已经发展到对所有共聚焦显微镜和相关技术的讨论。发送如下 e-mail 信息到共聚焦显微镜邮件列表可加入该协会: "Subscribe Confocal (your name)", 邮件地址: Confocal@listserv.acsu.buffalo 或与下列地址联系提供帮助: Paddock@facstaff.wisc.edu。

第二章 图像采集

一、三维图像构建

传统的显微镜只能形成二维的彩色图像，激光扫描共聚焦显微镜通过对同一样品不同层面的实时扫描成像，进行图像叠加构成样品的三维结构图像。它的优点是可以通过一系列的层面图进行 3D 重建，样品的立体结构分析，而且每一层面图都比普通荧光显微镜的图像结构清晰反差好，缺点是光线弱，可观察的样品信息量少（图 2-1）。

在亮视野条件下，圆柱视野的每一点都被同时照明和检测，样品体积为： $3.14 \times 100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m} \times 50\mu\text{m} = 1.6 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ 。在共聚焦条件下，在一个正方体截面的一点（ $0.2\mu\text{m} \times 0.2\mu\text{m} \times 0.5\mu\text{m} = 0.02 \mu\text{m}^3$ ）被照明和检测，全部扫描的样品体积为： $200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m} \times 0.5\mu\text{m} = 2 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ 。

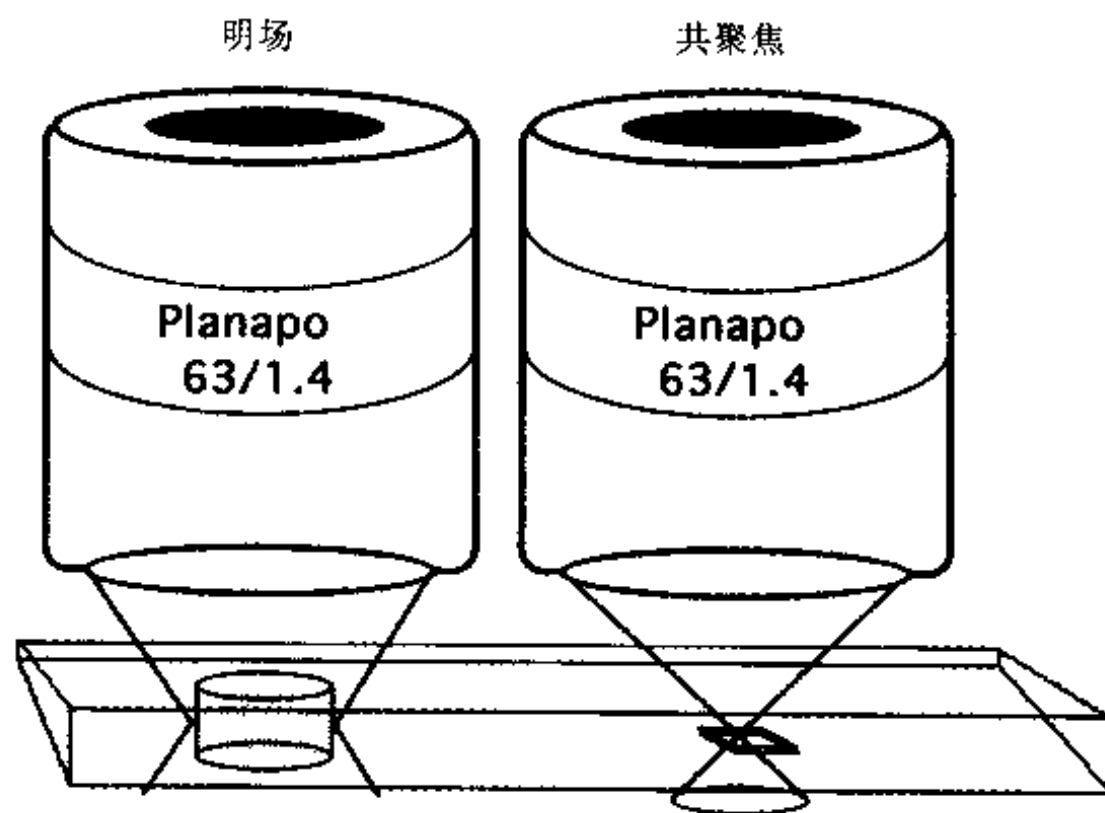


图 2-1 亮视野和共聚焦显微镜样品的空间和体积。对于一个 22mm^2 的盖玻片和 $50\mu\text{m}$ 的有效工作距离，样品的空间大小为： $20\,000\mu\text{m} \times 20\,000\mu\text{m} \times 50\mu\text{m} = 2 \times 10^{10} \mu\text{m}^3$

通过计算机可以显示 Z 轴不同的层面扫描图，根据波长的要求选用不同的激光和滤色镜。激光扫描共聚焦显微镜的另一重要优点是数字图像储存，可以很容易的进行图像处理。

在实验过程中有以下三个主要任务：验证新的实验现象；采集证实上述实验现象的数据；采集制作能说明实验结果的高质量图像并公开发表。

（一）验证新的实验现象

对于初学者来说要经过一段时间的训练才能熟练进行共聚焦图像的采集和说明。在观察样品细节之前，先要对样品进行总体观察，在脑子中形成一个总的印象。一般实验室都有常见的动物模型、细胞结构示意图和荧光标记说明。用激光扫描共聚焦显微镜对样品进行浏览，将需要仔细观察的部分记录在笔记本上以便进一步的观察分析。

(二) 采集数据

当在观察过程中有了新的发现,就要进行严格的实验设计来证实观察现象的科学性,揭示实验现象的内在规律和关系。如果还要进行统计学分析,就要进行大量的实验设计和观察,以提高数据的可信度。

如果要对样品进行细节观察,可将像素设为光学分辨率的一半,即所谓的 Nyquist 标准,在任何放大倍数下都可保证最佳的成像效果。观察部分的图像分辨率明显高于光学显微镜的分辨率,为了得到较多的图像信息,一般放大倍数不宜太大。例如,在研究细胞核的空间分布时,2 μm 的像素分辨率即可,如果每一个细胞核内的染色质都要显示出来,那么每一张图像的取样区域的分辨率就要提高 10 倍。

(三) 图像制作

激光扫描共聚焦显微镜的最后结果要有漂亮的图像输出,强调的是图像的质量,使图像有最大的信息量和最具吸引力的效果。Nyquist 标准和像素压缩并不能获得新的信息,但是可以增加曝光时间,通过从一个图像到另一个图像的平滑作用来增加信息量。内插法就是一种常用的方法,但不如直接从样品获得高分辨率图像的效果好。

要获得清晰的图像就要有较亮的光源、较低的扫描速度、很小的共焦光阑、低倍的 PMT 或很短的 CCD 积分时间,此时漂白率很高,扫描区域的扫描时间就要受限。应在不需要观察的区域进行扫描参数调节,然后调到快速扫描模式,选定观察区域,用最高分辨率进行一次扫描采样。

大多数实验室都可根据用户的不同要求对直接采集的图像进行加工处理,主要有以下的处理方法:

- (1) 直接进行图像平滑消除噪声点;
- (2) 直方图平坦化提高图像反差;
- (3) 设定阈值消除背底;
- (4) 设定自动背底扣除减小阈值;
- (5) 在整个动态范围内调节像素值;
- (6) 图层变换突出想要观察的通道图像;

(7) 最具感染力的共聚焦图像是 3D 重组图像,它用参考光源和阴影效果来显示立体图像,给每一个通道的图像设定通透值使其透明或不透明,以增强立体效果,即所谓的 SFP 重建。

二、材料

(一) 染料

在使用新的材料之前一定要保证仪器工作状态良好,用以下的染料作为实际的测试标准。制作一套显示这些样品的图像,然后将新的染料和这一套图像进行比较以示区别。

- (1) Rhodamine B hexyl ester, 1~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 染色活体或固定细胞的细胞膜;
- (2) Hoechst 33347, 10 μg 染色固定组织, 100 μg 染色活细胞 DNA;
- (3) Bodipy phalloidin, 10 μg 染色固定组织的 F-actin;
- (4) Rhodamine 123, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 染色活细胞的线粒体;
- (5) Carboxyfluorescein diacetate (CFDA), 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 染色活细胞。

(二) 透镜选择

由于激光扫描共聚焦显微镜所观察的区域一般都很小,低放大倍数或数值孔径小的物镜很难进行观察,激光扫描共聚焦显微镜图像都是在高质量的油镜或水浸物镜下观察得到的。通过减小扫描反光镜的扫描角度,放大和平移调节观察视野,使想要观察的区域显现在视野中(图 2-2)。

激光扫描共聚焦显微镜的分辨率取决于物镜的数值孔径和激发波长。用于激光扫描共聚焦显微镜的理想物镜应该是低放大倍数、高数值孔径。63 \times 油镜比 100 \times 物镜更好使用,因为它能提供很大的工作范围而不影响成像。物镜的工作距离是一个非常重要的参数,对油镜来说当浸没样品的介质厚度超过 50 μm 后成像质量下降很快,这时可以用工作距离较大的物镜来补偿。

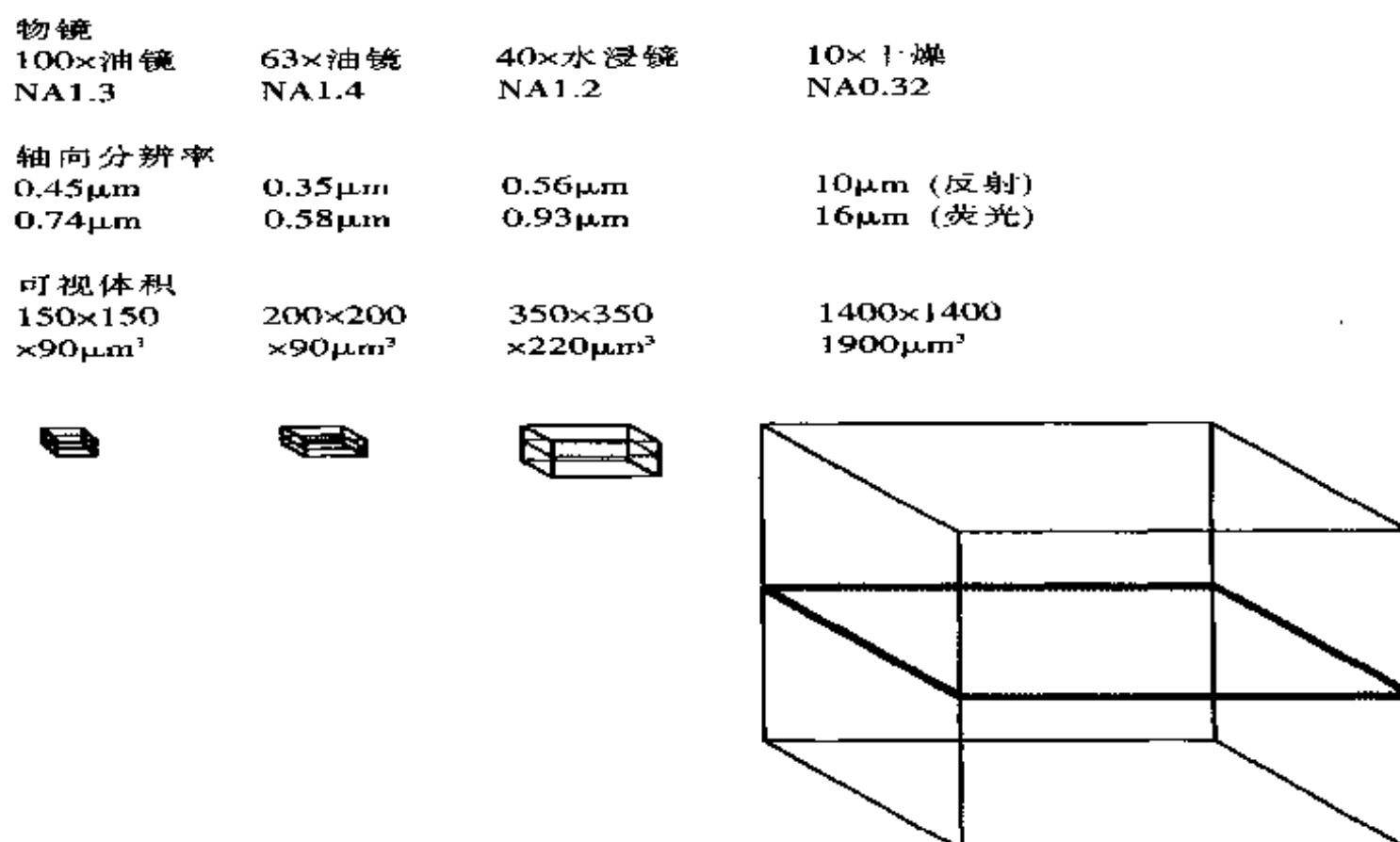


图 2-2 可获得的样品体积。4 种常用物镜的关键指标显示如上。注意：如果数值孔径 (NA) 不变，使用更高倍数的物镜没有优势，因为分辨率没有增加，但可检测的样品范围却减小了

1. 水浸物镜 在激光扫描共聚焦显微镜中目前趋向于使用水浸物镜，虽然它的数值孔径较小，价格比较昂贵，但由于两倍的工作距离和水浸样品非常方便，所以有其明显的优势，它也可与 UV 镜兼容。一个高质量的水浸物镜可以代替普通光镜和油镜，这样实际上降低了仪器设备的成本。

2. 普通物镜 有些样品不能浸在液体中，必须保持干燥，就要用普通物镜。虽然普通物镜的数值孔径和分辨率都比相应的浸没式物镜小，但它却有较长的工作距离和干净的成像环境。

3. 深入式 (dipping) 物镜 对没有盖玻片的水性样品可以用深入式物镜直接进行观察，物镜截面很小便于深入培养皿中。透镜包在抗生物腐蚀的陶瓷或聚氟四乙烯中，它最适合于倒置显微镜的培养细胞观察，因为较长的工作距离便于加入抗体，免去了单独的试剂加入操作室的麻烦。

(三) 测试样品

1. 多种激发波长亚微米珠 多种激发波长亚微米珠是激光扫描共聚焦显微镜最常用的测试样品，它的珠径小于光学显微镜的极限分辨率，对任何波长都可激发荧光。Tetraspeck 珠 (Molecular Probes) 可以用从 354nm 紫外到 647nm 红外的所有常用激光器激发，球径为 0.1~0.4μm。

2. FocalCheck 珠 分子探针公司提供一系列 15μm 的 FocalCheck 珠，通过可见的染色图像准确显示仪器的合轴精度，它比多线亚微米珠使用方便。将 5μl 的 FocalCheck 珠稀释液用移液管均匀涂在载玻片上，待干燥后滴一滴封片胶，用 22mm No1.5 盖玻片封片即可用作测试样品。Permafluor (Lipshaw Inc., Detroit, MI) 是比较好的封片剂，因为它是水溶性的不会溶解荧光素，而且风干很快。

以上两种测试样品对 Meridian/Tr 系列的常规合轴和最终测试非常有用。UV/Blue FocalCheck 专门用于 Meridian Ultima 独立的 UV 和可见光光路合轴，Blue/Orange/Red FocalCheck 用于测试可见光共聚焦显微镜，如 Meridian InSight。

3. 斜面反光镜 通过采集一系列的斜面图像来测试轴向的分辨率，如果 Z 轴的两个图像距离等于或大于分辨率，图像最大的亮度投影将显示一系列的平行亮带；如果 Z 轴分辨率较低，所有的线将合并成一条粗线，轴向分辨率就等于两个相邻的亮线刚好能分辨时的步距。最理想的反光镜是银反光镜，但是如果光路效率很高，普通玻璃也可以做反光镜。将两个反光镜用胶粘成一定的角度，这样反光镜不但可以形成一个斜面，而且可以稳定地放在样品台上。

4. **芯片** 横向分辨率的测试样品制作较难。芯片上的痕迹可用于反射图像的测试,但它只用于数值孔径较小的物镜分辨率测试。有一种镭膜测试板可以在市场上买到,它是在玻璃上涂有精确间隔距离的镭膜条纹,但价格较贵,而且没有亚微米细节。

5. **硅藻** 不同种类硅藻的重复结构可用于分辨率的测试,大多数生物公司都有硅藻出售,如 Carolina Biological 可单样购买或成套购买。一旦系统进行了合轴,可将图像存储作为以后的参考。硅藻也可放入油中用作荧光团参考标准,此时形成负像,即样品黑色背底亮。

6. **花粉** 对于共聚焦成像,花粉是最有效的测试样品。花粉种子木化的外骨架能够被吖啶橙(acridine orange)染色,可使自然荧光亮度加强且稳定性提高而不被漂白,百合花粉种子主肋板有三角形的特点,当系统合轴不好时主肋板会向一侧弯曲,当合轴后就会变得单、直、清晰。

7. **荧光纸** 有些不同档次的纸有自然的荧光性,如亚麻纸在蓝光激发下有微弱的荧光,特殊纸张如亮黄色的粘纸荧光就强些,也可以将滤纸浸到常用的任一荧光染料中染色。为了减少光散射,在观察之前将纸浸在油中,这样可以提高穿透性,形成深层图像。

8. **荧光塑料** 用于制作儿童玩具的彩色塑料都有荧光特性,可以制成整张或薄片进行系统合轴。

9. **薄层荧光染料** 在载玻片和盖玻片之间放入少量的荧光液即可制成非常薄的荧光板。将不同的染料适当混合可以在三个或四个激光同时激发下产生相同强度的荧光。

10. **混合珠切片** 常用的荧光球可以混合使用作为一般实验的测试标准,如含有少量荧光球的切片可用于测试常规自动搜索,只要知道珠的比例、大小和亮度就可以确定其过程、分布特性。

11. **活细胞** 培养皿中的活细胞可以在几分钟内用细胞膜染料如 Rhodamine B hexyl-ester (hexyl-rhodamine, $10\mu\text{g/ml}$) 进行染色,它可以标记所有的细胞膜,缺点是在稀释后荧光较弱。固定的细胞也可以用 DNA 染料如 Hoechst33342 ($10\mu\text{g/ml}$) 快速染色,在高浓度下 ($100\mu\text{g/ml}$, 1h) 也可以染活细胞。

12. **活体植物组织** 藻类或植物的快速取材样品因含有叶绿素,不需要做任何处理即可显示淡淡的红蓝色荧光。由于洋葱是层状结构很容易制成切片,方法是将切好的薄片夹在载玻片和盖玻片之间。它的外表皮发绿色荧光,它的木质部分有较宽的激发和发射波长;在根部两层之间的表皮可以用 hexyl-rhodamine 进行染色, DNA 用 ethidium bromide 染色,该染液的渗透压较低,可以看到细胞质中排列整齐的小囊。

三、方法

(一) 用多通道亚微米珠进行仪器测试

1. **视场平度调节** 如果系统合轴很好,在调节 Z 轴时整个视野应该在一个焦平面上。如果视场不在一个平面上,可以用较小的步距进行 Z 轴扫描,然后进行数据阴影重建。

2. **轴向分辨率** 对任一激发和发射波长的荧光都可以用单层荧光球测定轴向分辨率。用 Tetraspeck 进行 X-Z 图像扫描,然后取一条垂直线,轴向值为最大宽度值的一半,即 X-Z 图像中亮度为最大亮度一半时两个点的距离。

3. **色差** 一般物镜的中心视场色差都较小,荧光球图像上的每一点发射的光,通过不同的通道都可以聚焦到一个点上。可以通过视场中间和四周荧光珠进行直线测试,一般情况下球面差比轴向差大。

4. **Z 轴重复性** Z 轴机械重复性可以通过 Tetraspeck 球的一个平面,采集两组 Z 轴系列图来进行测试。两组图对应水平的荧光球应该正焦,且亮度最亮。

5. **颗粒分析** 用混合荧光球可以测试整个系统的颗粒亮度分辨本领,用流式细胞仪对系统进行校准。

(二) 用 FocalCheck 球进行系统测试

1. **色差** 由于 FocalCheck 球比多通道亚微米珠可视度强,粒子大,所以测试较容易,大荧光球很容易进行精确的线性定位测量。在进行合轴时,可以用单个 FocalCheck 球的散射图来进行色差测定。

2. **图像分析** FocalCheck 球的图像应该是圆形的, 在视野的任何位置其最大直径都是相同的, 可以搜集视野中的荧光球最大亮度, 然后测试其大小和形状。

3. **Z 轴校准** FocalCheck 球的一张 X-Z 图像就可以显示出 Z 轴的工作状态, 由于荧光球是球形, 它的共聚焦图像应该是大小相同的圆。如果是荧光球较大的样品, 应该多加些封片胶, 这样在硬化收缩时不会压到荧光球。

4. **折射率的校正** 如果样品的折射率和浸入液的折射率不相配, 就会产生 Z 轴方向的误差。如果两个折射率和物镜的数值孔径已知, 就可以对误差进行补偿, 使最终数据在任何方向上都准确无误。

5. **激发光的合轴** 对 FocalCheck 球进行多通道 X-Z 图像扫描, 就可以显示合轴情况。如果两个通道有小量的垂直方向位移, 就会在每一个 FocalCheck 球圆形图像边缘的上边或下边出现单色的晕, 说明合轴有小量偏差。同理, X-Y 扫描图像可以显示横向合轴情况, Z 轴图像可以显示两个方向的误差。

(三) 样品观察: 在明视野下确定观察区域

共聚焦的成像范围非常有限, 在镜下只能看到样品很小的一部分 (图 2-1)。例如有 22mm^2 盖玻片的标准切片, 用工作距离为 $100\mu\text{m}$ 的物镜进行观察, 它的可视范围是 $20\ 000\mu\text{m}\times 20\ 000\mu\text{m}\times 100\mu\text{m}$, 而共聚焦只有 $200\mu\text{m}\times 200\mu\text{m}\times 0.5\mu\text{m}$ 。如果采集一张图像需要 1s , 要观察同样范围的样品, 就要用 46h 。

显然, 用共聚焦的高分辨率扫描观察样品是行不通的, 必须采取一定的策略步骤先对样品进行低倍下的观察定位, 然后再用共聚焦进行高倍观察。

1. **墨水标记和画痕** 将样品放在盖玻片的中心, 在旁边画上記号, 这样就可以很快在共聚焦显微镜下选定观察区域; 如果是倒置显微镜, 用低倍观察时可以在底部标记或画圆进行样品定位。这些记号在聚光照射下很容易观察到, 而且不会浸到封片胶或被清洗液冲掉。

对于很薄的样品, 在封片之前用记号笔或金刚石笔在样品边上做记号, 而且这些记号与样品基本上在一个焦平面上, 所以很容易观察到。由于光源和采样通道都在盖玻片以上, 记号不会对共聚焦成像产生影响。

2. **全视野浏览** 在样品移动的过程中, 由于光的散射或荧光颜色的改变, 即使不在焦平面上, 普通显微镜也可以通过目镜直接观察到模糊的图像。对倒置显微镜, 由于在载玻片下边有清晰的视野, 图像很容易观察到。对于普通的正置光学显微镜, 载玻片本身的散射光就足以观察到样品标记。然而, 在激光共聚焦显微镜下, 样品要么在焦点上, 要么在焦点外, 要找到样品就非常难, 特别是对初学者更困难, 所以, 必须先普通光学显微镜下进行样品观察, 然后在共聚焦显微镜下观察就会心中有数。

3. **寻找观察区域** 对于均匀一致的样品, 如盖玻片上的培养细胞, 就不需要进行全视野浏览定位, 直接进行仔细样品观察。对于结构不均匀的样品, 要先在低倍镜下进行粗略的浏览, 从盖玻片的一个角水平观察到另一个角, 然后往上或往下移动一个视野, 再反向移到另一个边, 如此反复直到整个盖玻片浏览一遍。在浏览过程中记住感兴趣的区域位置, 以便进一步的仔细观察。

4. **选定观察区域及照相** 样品上的标记在显微镜下一般较易找到, 可以将其记录在实验记录本上。目前, 大部分显微镜的样品台都有 X-Y 坐标刻度, 它只能进行粗略的定位, 要进行精确定位就比较困难。如果要将样品从一个显微镜上移到另一个显微镜上观察, 那么两个显微镜样品台的坐标就要进行转换。

在载玻片上刻上网格, 就可以进行标准尺寸定位。可以用如下方法制作网格载玻片, 先在盖玻片上放一网格, 通过它在盖玻片上沉淀一薄层碳; 另一种定位方法是, 当找到观察区域时, 不要移动样品台, 而是将载玻片移走, 然后放上校正标尺, 通过目镜读取刻度。

5. **不透光样品的表面照明** 当样品太厚或透明度差时, 样品内部的平面聚焦就会受到影响。如果有荧光, 那么就可以用汞灯进行观察, 此时用于反射成像的分光镜不起多大作用。用于针孔合轴的方法也可以用于范围调节, 选择一个较大的针孔, 然后交替调节增益和聚焦, 直到平面亮度达到最大。

如果以上方法都不能实现, 可以用闪烁光斜照样品。新的 Meridian/TR 系统有一个很窄的鹅颈管, 光线可以持续的照射在桌面上, 它可以放在样品下非常靠近物镜的地方, 也可以用弧光灯的抛物面将光

线反射聚焦到载玻片上的样品上。

6. 全视野的荧光观察(汞灯或激光) 大部分样品都可以用普通显微镜进行观察定位,有些荧光染料在白光激发下可以发射较强的荧光。对于水浸样品,水和样品的折射率不同,可以利用白光和相位差观察到样品。用汞灯光源进行全视野荧光观察,很容易找到要观察的区域。由于激发波长不同,以及人的视觉对绿色比较敏感,所以在对样品进行扫描观察时,不同的颜色将会差别很大。

共聚焦显微镜只能用同一种激发波长和吸收波长,这样可以使共聚焦灵敏度提高。Meridian ACAS 系统 Ultima 有光线扩散器,使激光光源可以用作全视野荧光观察光源。人眼的动态范围比 CCD 或 PMT 要大许多倍,有照相功能的共聚焦显微镜如 Meridian In Sight 也可以同时直接观察共聚焦荧光图像,当焦平面调节到样品上时亮度就会增加,可将光阑调到最大,等找到样品后再将其调回到共聚焦成像模式。

(四) 选择

由于每一台共聚焦显微镜配有不同的系统和附件,每一台共聚焦显微镜都有自己的优势和不足,我们应该熟悉仪器各种性能参数和应用条件,充分发挥其性能优势。共聚焦有一套样品观察定位的有效方法,只要熟练掌握就可快速找到想要观察的区域,荧光观察应快速完成,避免荧光淬灭。

1. 共聚焦目镜观察 将共聚焦调到目镜观察状态,用 InSight 和旋转盘系统进行实时扫描观察,调节样品台和焦距对样品进行全视野浏览,选定观察区域,然后移走目镜上的分光镜,图像通过 CCD 进行采集和储存。通过旋转盘系统的光线非常弱,不能用于反射成像,而缝隙 SLIT 扫描的光线强度可用于荧光视频成像。人眼的动态范围和分辨率(150 000 个细胞/mm²)远大于 PMT 和照相系统,可以进行样品的动态观察,用眼睛直接观察到的图像比计算机屏幕显示的图像信息量要大很多。

具有标准的 InSight 和点扫描的共聚焦显微镜,可以用 InSight 对任何样品进行快速缝隙扫描观察。观察荧光亮度时,这在点扫描状态下是很难做到快速扫描观察的,最好用慢速扫描进行仔细观察。最新的 InSight 在 X 轴和 Y 轴有相同的点扫描分辨率,InSight Point 还可用于 Z 轴的最优点扫描分辨率。

2. 切换扫描 当进行快速浏览扫描定位时,由于扫描速度快图像质量较差,一种简单的改进方法是快速扫描和慢速扫描交替进行。在快速扫描模式下,光路设置在最优化条件下,在 1s 内可以扫描几帧图像,在此条件下图像分辨率和效果有所下降,利用其速度优势可进行全场扫描。

3. 快速 X-Z 扫描 徕卡共聚焦显微镜有一个快速 Z 扫描旋转装置,它可以使 X-Z 图像扫描和 X-Y 图像扫描一样快,调节焦平面和 X-Y 图像扫描一样简单,然后调节样品台高度使焦平面切割样品。

4. 卡尔曼(Kalman)平均 利用数据平均的方法减小 PMT 噪声干扰,提高图像质量。具体方法是,对一个像素点取多个值然后进行平均,对一条线取多组数据进行平均或者对整幅图像进行多次扫描然后进行平均。Meridian Ultima, TR 和 InSight 都使用以上方法进行图像处理。

Bio-Rad 采用不同的加权平均法,它可对图像有重要意义的因素增大权重。在使用 Kalman 滤镜的情况下,调节样品台和焦平面,只要不改变样品位置,即可得到高质量的图像,这是获得高质量图像的很好的方法之一。

5. 定位 在样品台/反光镜扫描系统中,可以进行大范围的预扫描观察,然后用定位功能扫描中心区域。这样可以获得高分辨率的 X-Y 图像或选定 X-Z 图像的切平面。Zeiss 410 可以在预扫描图像中任意画一斜线进行图像扫描。

6. Pan/Zoom 在 Meridian/Tr 系统中使用 Pan/Zoom 功能可以选择预览图像的放大倍数和位置,用画长方形的选定,重复进行选定,最后得到最大放大倍数。在 Pan/Zoom 下还可以修改位置和放大倍数设置(图 2-3)。有些共聚焦显微镜可以采集图像不同深度的亮度,然后保存每一个像素点的最大亮度值,它主要用于将立体图像合成一张图像,是采集四维数据的常用方法,可以记录不同时间点上单个 Z 轴系列结构数据。

7. 快速 Z 扫描 有照相功能的共聚焦显微镜的优点是,对图像上的每一个点可以同时进行数据采集。采集速度由照相速度决定,所以可以达到视频数据采集速度。另外通过调节聚焦平面的高度,在 1s

内可以采集样品 $50\mu\text{m}$ 厚度的 3D 数据 (图 2-4)。

8. 聚焦、增益、灰度的自动调节 从理论上讲, 焦平面的调节、增益和灰度都可以进行自动调节, 最后得到高质量的图像, 如同扫描电子显微镜 (SEM) 的自动聚焦一样。但是在实际中, 共聚焦显微镜在共焦视野中很难做到自动参数设定。

SEM 有一个非常大的景深, 而共聚焦的景深却非常小。SEM 通过自动调节可以得到最高的反差, 但是最高反差并不是光学图像的最佳聚焦平面, 共聚焦图像增益和灰度的自动调节相对容易些, 通过采样

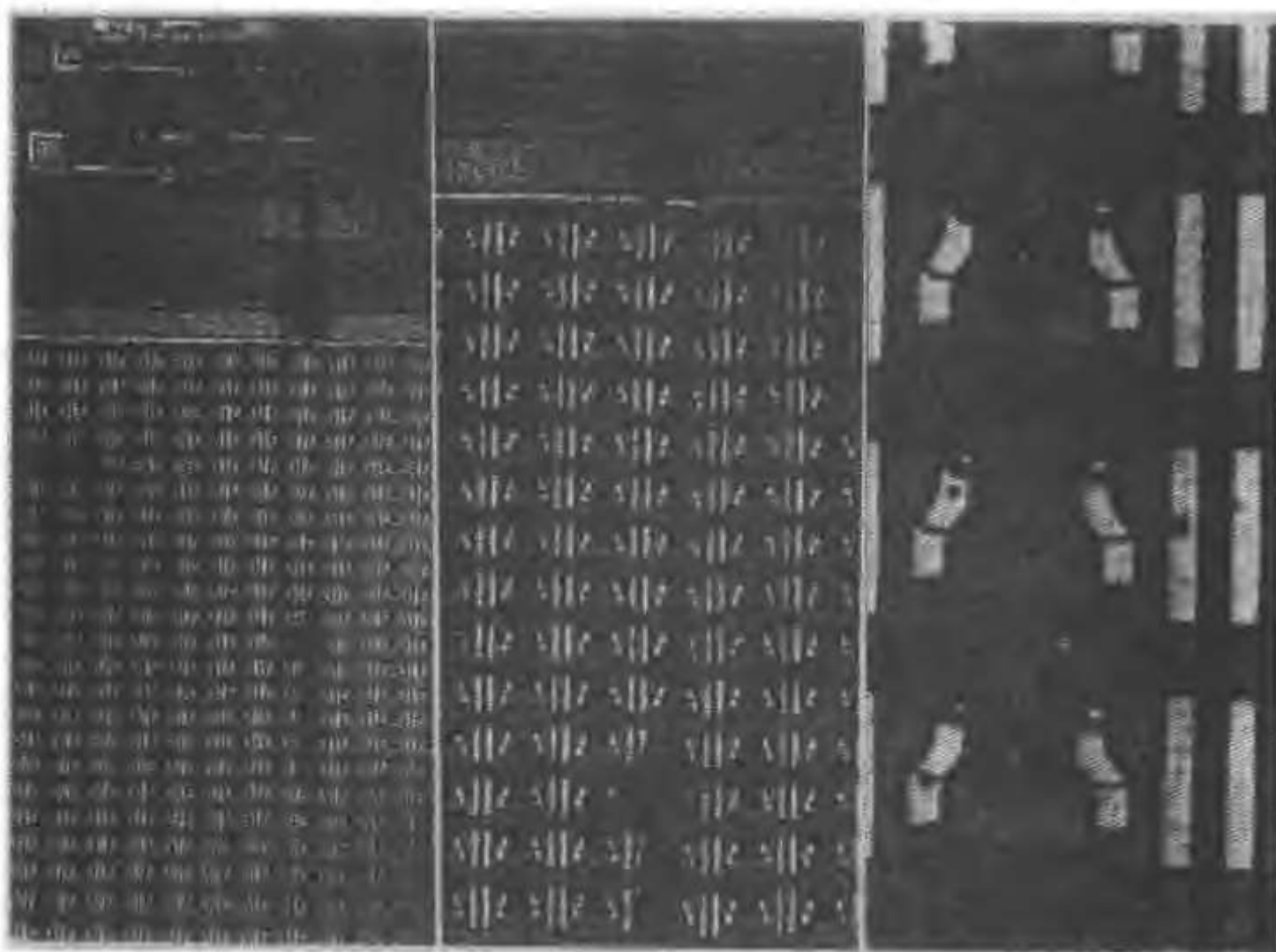


图 2-3 自动调焦。这些图像都是通过同一物镜采集不同的区域扫描获得的结果, 在大视野选定感兴趣区域后, 进行不同 zoom 值放大, 即可获得更大放大倍数的图像。该芯片上亮块的厚度为 $5\mu\text{m}$

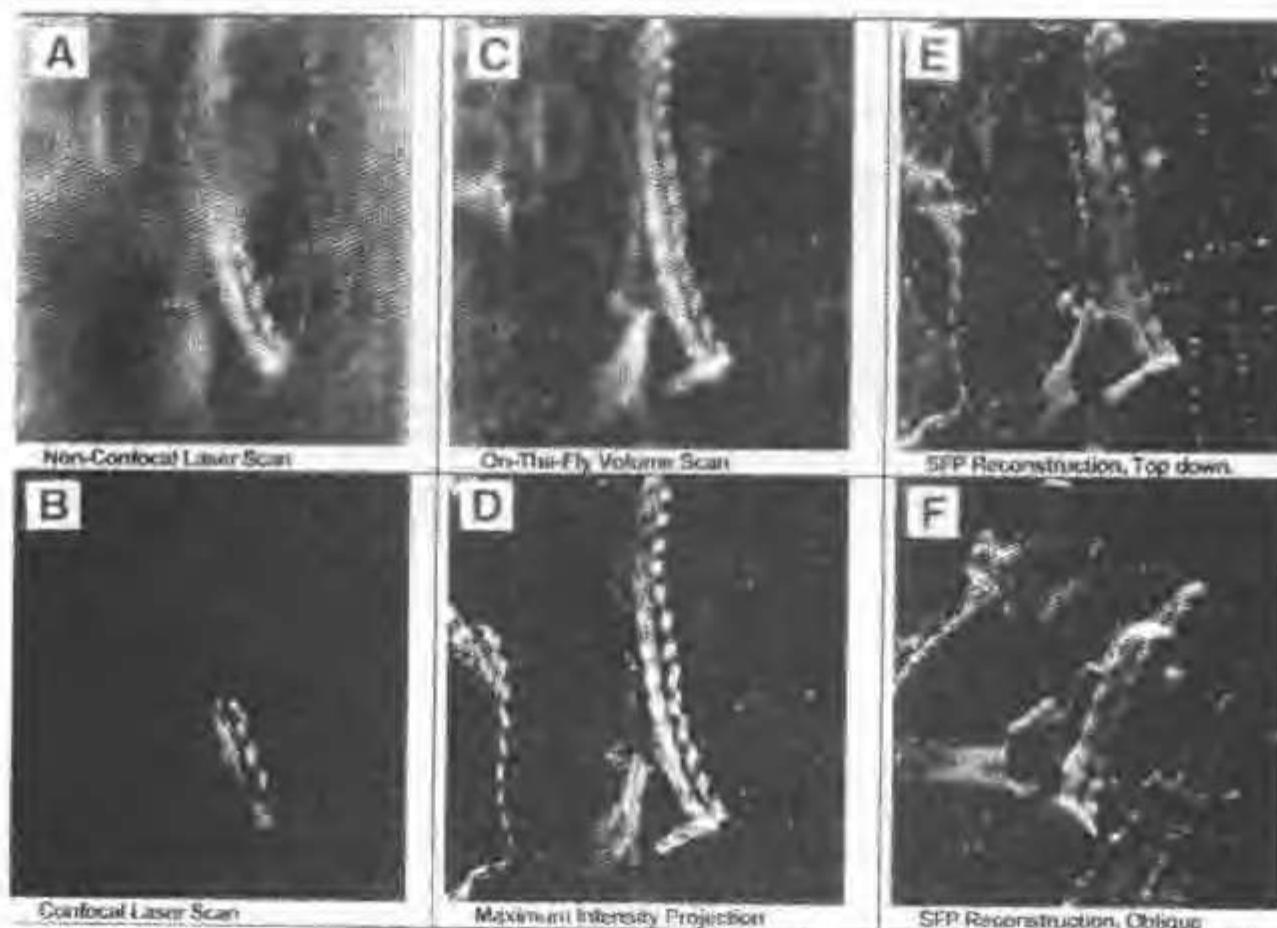


图 2-4 快速三维重建

将图像最暗的像素点的灰度值设置为零，将最亮点的灰度值设为最大饱和值就可以了。

(五) 屏幕显示

用显微镜观察样品通常受主观意愿的影响，对某一特定样品观察时间越长，越觉得像想要得到的实验结果。如果某一现象被观察到并进行了描述，那么这一现象在以后的研究中就会变得越来越明显，这是由于人脑已经形成了固有的模式。共聚焦并不要求象临床病理医生那样严格的标准，有时只需要严格的选择过程。而粘附细胞流式细胞仪可以根据给定的荧光强度自动进行识别、列表、访问和成像。

1. 快速浏览 使用 ACAS 和 Ultima 的 Quick Look 可以在屏幕上显示整个样品的荧光分布图。设定像素亮度范围以减少扫描区域，一旦所选阈值满足要求，全部细胞就被列表，然后便可进行自动扫描和细胞定位分析。

以上方法可用于排除偶然因素，也可用于阳性细胞的次代培养。细胞在 Cookie Cutter 盘中的吸热胶片上培养，需要随时了解细胞总数和阳性细胞的情况。在阳性细胞较多的区域，用强激光束熔掉盘底部的膜，使细胞数减少。剥去阴性细胞的区域，让阳性细胞在暴露出来的区域生长。

2. 结构列表 除了可以获得样品分布表格信息以外，还可以通过重复采样获得任一区域的分布结构图。首先，选定样品边界，在选定区域内没有细胞重叠，然后就可进行扫描区域内的数量统计。

3. 选样 如果选样或样品空间定位很难满足特殊研究的要求，这时可以用网格定位方法对整个样品进行扫描定位，这一方法对切片组织结构不是均匀一致的组织形态学观察非常有用（图 2-5）。

对较大的组织学切片，先使用台阶式扫描，然后再对选定区域进行高分辨率扫描。ACAS 和 Ultima 可以在 10cm×8cm 的范围内进行分辨率 1 536 像素的扫描。

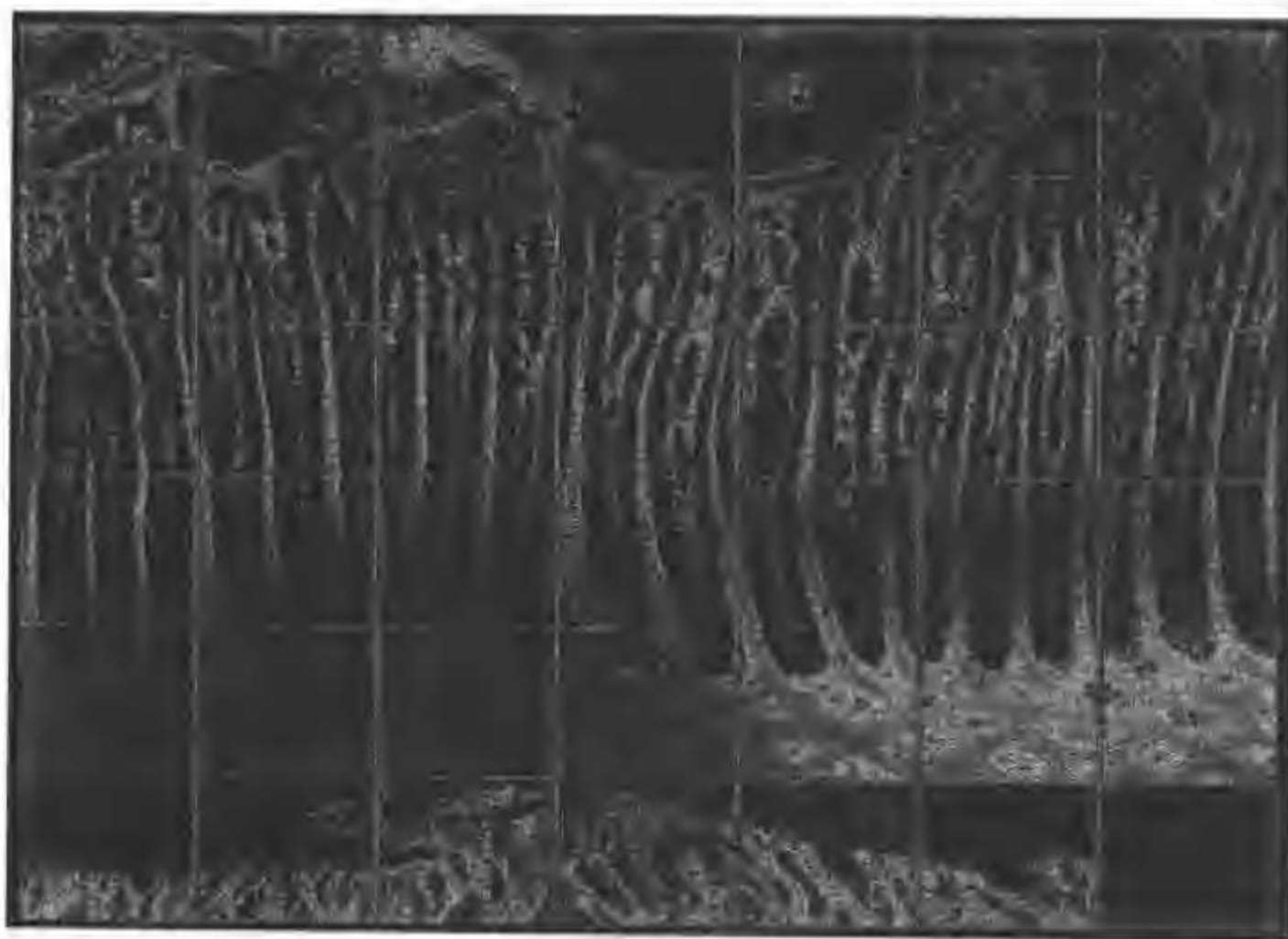


图 2-5 马蹄层的组织学图像组合

(六) 常见问题

共聚焦显微镜最常见的问题是在进行图像扫描的时候，屏幕一片空白没有图像，这种现象可能是选择的样品没有荧光、系统设置不正确、系统硬件或软件有问题造成的。解决的方法是：检查激光束是否扫到样品上，更换滤色片，提高 PMT 增益，观察荧光屏上是否有显示信号，然后用普通光学系统进行明场或全场荧光观察。如果不能解决问题，就要更换一个性能效果比较稳定的样品一步一步进行认真仔细

的调节。

1. 激光光束是否到达样品上 只要样品是透光的,通过样品的散射光就可以很容易地判断激光是否达到样品上。或者将支架移走,将磨砂玻璃放到光路中进行观察。不要直接用眼睛直接观察,可以用荧光塑料或荧光纸观察 UV。

2. 激光器是否发光 较大功率的激光器在关掉后都需要一段冷却时间,在此过程中电源和冷却系统还在工作,冷却系统的声音并不能说明激光管在工作。

3. 快门和滤色片设置是否正确 用于研究工作的高档次显微镜一般都有一个附加的旋钮和操作杆,可以进行光学通道和共聚焦通道转换,检查旋钮和操作杆位置是否正确。

4. 共聚焦光阑是否太小 在通常的荧光成像中尽量避免使用过小的光阑,小针孔适用于反射或较亮的荧光样品。

5. 样品是否标记或视野选取是否正确 视野中不同的荧光团会产生不同亮度的荧光,如果在全场扫描能观察到的荧光,在共聚焦下也一定能够进行详细观察。标记很好的样品能够得到满意的图像,如果标记不好,必要时可进行重新标记。

6. 增益或背底设置是否合适 有时要将显示器的亮度进行调低或关掉,以减小背底亮度,以便观察到荧光较弱的样品。如果屏幕还没有图像显示,可显示保存过的图像,检查显示是否工作正常。

7. 滤色镜和色轮 检查滤色镜和 cube 选择是否正确。在有自动方式的系统中,使用全色滤色镜以增加图像采集效率。

8. 计算机显示的图像通道是否正确 先将所有的通道显示在屏幕上,选定一个能分辨弱信号的调色板,然后提高增益和亮度使图像清晰可见。如果明场照明对透明样品没有效果,那么探测器可能探测不到光信号。

9. 所有部件是否正确连接,电源是否打开 在进行视频录像和计算机数据存取时,要将 VCR 电源打开。检查电缆线连接是否正确,显示器的亮度和对比度是否合适。当显示器有视频信号时指示灯为绿色,否则显示黄色或不显示。

(七) 工效:环境舒适轻松

共聚焦的使用是比较昂贵的,使用时间也是有限的。使用者一般都是在精神紧张,注意力高度集中的情况下进行观察,所以,要有一个宽松舒适的工作环境,必要时可配备相关的附件和设备。

1. 设备布局 对于不经常使用共聚焦显微镜的使用者来说,对共聚焦显微镜系统的布局不很熟悉,所以,系统的空间分布要合理,使用操作要方便。对于经常使用共聚焦显微镜的使用者来说,要记住系统的基本布局,基本操作流程,以便提高观察效率。检查室内光线是否太亮或太暗,键盘操作是否方便,座椅高低是否合适,是否有足够的工作空间,是否有操作手册,冷却风扇是否工作正常,这些都是应该注意的方面。

2. 照明 共聚焦显微镜要在暗室中进行观察,为了观察记录和操作方便,可以使用小功率的台灯作为照明。Meridian TR 本身配有一台长臂台灯,可以进行弱光和红光调节,这样可以和环境光线相协调,有利于对弱荧光样品的观察定位。

3. 防震台 早期的共聚焦显微镜是安装在标准大小的防震台上,在进行样品定位观察时很不方便。现在的共聚焦显微镜,基本上都是安装在用户自己设计的防震台上,这样就可以根据用户的要求将显微镜放在普通桌子上或整体放在一个底盘上。系统本身的工作空间一般都比较有限,可在系统旁边放一工作台,以便放置记录本、浸透液、组织和样品。打印机和储存设备也需要较大的空间,同样可以放在旁边。

4. 存储 对于采集的原始数据必须进行保存,为了防止数据丢失,许多系统都有数据备份功能。当数据采集完成后,可以使用滚动条查看有日期标记的数据文件。用户一般是按照题目内容进行分类,而不是按照日期。系统由于空间和速度的原因,一般不会对数据进行长期保存,用户必须对数据进行分

类和备份,便于数据查找和管理。

5. **噪声** 激光光源和冷却系统有噪声,对使用者有一定的影响。如果环境噪声太大,一般计算机都有 CD 播放功能,可戴上耳机欣赏 CD 音乐,排除噪声干扰,也可将观察部分和激光光源部分隔离安装。

(八) 软件设计

大多数菜单式软件都是将一组功能放在一个标题下,放在工具箱中,而很少提供帮助来说明如何使用这些菜单命令。另一种有效的方法是使用程序模块,每一模块都可以指导用户完成一个实验操作过程。但由于需要根据用户的不同要求以及相关的专业知识,这一逻辑软件很难设计。另一种软件是在工具箱内,使用向导、宏指令、模板和提示卡,借助这些方法,用户可以充分发挥工具箱的作用。操作流程可以使用户通过大量的选择按钮,快速重复实验过程。

1. **宏** 宏是通过一个关键词或组合键完成一系列的命令,它特别适用于重复的操作过程,如对每一个样品都使用完全相同的操作流程时,宏指令非常方便、有效。

2. **参数模板** 多数共聚焦显微镜可以保存设置的参数,作为单独的参数文件或与图像文件一起保存。如果进行某一设定的扫描观察,可以装载保存的设置参数。参数模板在对样品进行相同条件下的观察对比分析时非常有用。

3. **向导** 向导是较常用的程序组件,使用者只需做一些简单的选择,就可以完成相应的任务。例如,TR 就有一个 Dye Wizard,它可以用内存的荧光光谱数据库同时探测计算多色染料的光谱最佳分布。它在数据库中将染料列出来,用户也可以添加自己的染料,然后选择要使用的染料,系统将检测染料的可行性,确定最佳的探测方案,最后,设置相应的硬件和通道标记。

4. **Cue cards** Cue cards 可以提供有关的信息和快捷方式,完成不同的指令,像宏指令一样完成用户定义的一系列指令或者像向导一样提供有关的命令选项。例如,要进行 SFP 重建,必须进行 Z 扫描,过滤数据噪声,设置阈值,必须进行图像前期处理,保证图像质量,然后进行系列动态处理。一个 SFP 流程图包括每一步的动作项和设置参数的详细说明。与向导不同,它的每一步都可以随时进行设置调整,屏幕上的菜单也可以同时使用。

(九) 耗材

激光管寿命: 激光管的平均寿命一般较长;离子气体激光管的寿命最短,但由于它的亮度和颜色较好,被大多数共聚焦显微镜所使用;氦/氖激光管也有较好的颜色,但亮度较低。100 mW 的氩离子激光管寿命大约 2 000 h,而 5 mW 的氦/氖红色激光器的寿命可达 25 000 h;水冷式氩离子 UV 激光管的寿命大约 5 000 h。

第三章 激光扫描共聚焦显微镜的测量

一、测量前的准备工作

(一) 合轴

显微镜的精确合轴对准确测量至关重要。对所有的显微镜来说，合轴原理都基本相同，不同的显微镜系统在具体的合轴操作上有所不同。下面所介绍的方法仅用于点扫描共聚焦显微镜，主要包括 Nipkow 盘、缝隙扫描、点/缝隙扫描等系统。

如果针孔没有精确合轴，当显微镜聚焦时就无法达到最大亮度，这样必然影响测量的精度，特别是对深度和密度的测量影响较大。如果针孔大小可调，可将针孔调到最小进行合轴调节，合轴完成后再将针孔打开。任何的合轴都无法达到绝对的同轴，只是相对的。合轴的测试方法是将针孔调到最小对测试样品进行垂直切面扫描，如果没有合轴，非常薄的结构将显示双层像（图 3-1）。

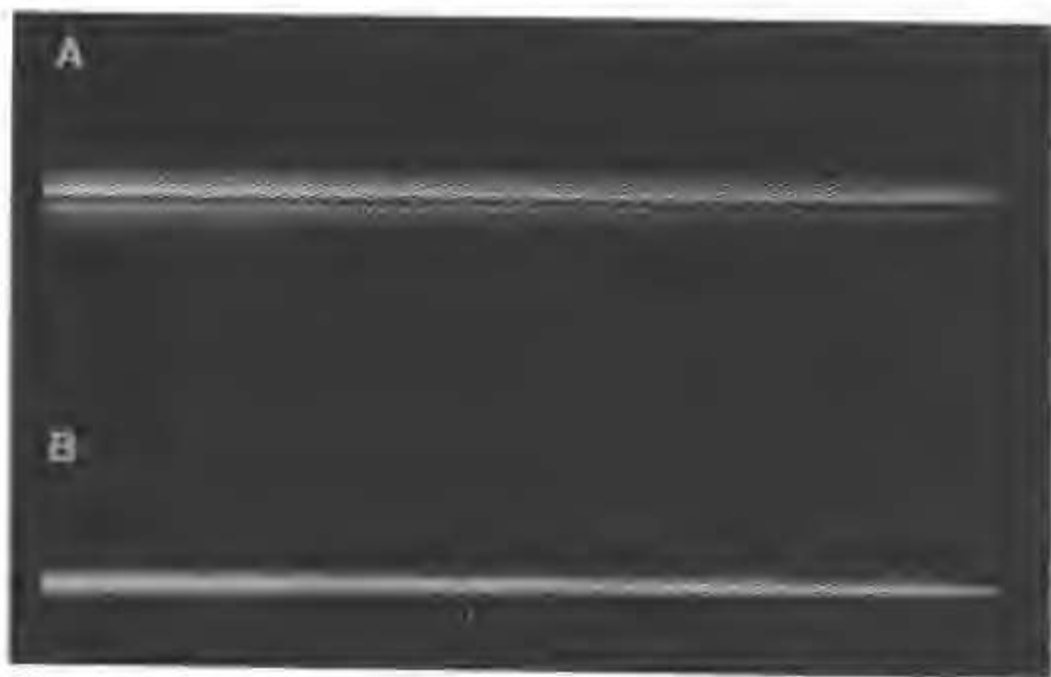


图 3-1 一种镜像 (mirrored) 盖玻片的共聚焦反射成像。在针孔没有合轴时的 XZ 轴图像，注意反射面成双线结构 (A)；针孔正确合轴后，表面则为单线结构 (B)。

扫描轴心必须在物镜的后焦平面上移动，否则将会出现图像中心区域比边缘暗的现象，这会严重影响测量结果，特别是在图像灰度值变化较大的界限处更为突出。有些生产厂家提供棱镜附件来进行检测，如果没有提供棱镜则说明该显微镜是镜筒无限长，只要将物镜取下，在台子上放一薄片即可进行测试，注意不能用反光的物体如镜子或载玻片。激光回路应该是稳定的，如果不稳定，需要做适当的调整。例如 Bio-Rad 公司的产品：显微镜和共聚焦头之间的分光镜高度是通过螺丝来调节的。调节之后共焦和光学系统需要重新调节使它们正焦，这样才能使共焦图像和通过目镜看到的图像重合（如果严重偏离会影响显微镜放大倍数）。仍以 Bio-Rad 公司的产品为例：通过调节整个共聚焦头的位置高低使两个光学系统正焦。

共聚焦光学系统的视野在整个光学视野的中心，这样才不会影响测量结果和分辨率，因为成像光线

通过透镜中心区域的成像效果最佳。照明光线应通过共焦像,有些显微镜在低倍时光线不均匀,最好在高倍下观察。

(二) 反差校准

要进行精确的测量并不一定要求图像在观察时处于最佳状态,在进行任何亮度和尺寸大小的测量中,最基本的要求是背底亮度为零。这一要求对位置和深度的测量影响不是很大,但通常情况下建议满足这一条件,以避免可能的错误和误差。在大多数情况下,背底对应的是光电倍增管(PMT)的暗电流,而样本的背底荧光因样本的不同而不同。首先将样本拿走调节背底,使其刚好不为零为止,最终的背底效果可能比选择的背底效果亮一些。在有些系统中将自动获取和背底控制设为默认状态。

对于任何一种测量,图像中的任何一个像素点的亮度值都不能超过系统可记录的最大值。有些显微镜(如 Bio-Rad MRC 500 和 600, OptiscanF900e)有 16 位图像储存选择,此时最大的亮度值可达 65 000(可满足实际应用中的任何标本要求)。但有些显微镜只能储存 8 位图像,记录的最大亮度值只有 255,在实际中很容易超过,有必要调节 PMT 电压或放大器增益使样品的最大亮度值不超过饱和值,否则将无法测量饱和点的亮度、位置和深度。

总之,在使用激光扫描共聚焦之前,必须进行精确的合轴调节、PMT 增益调节和背底调节,以避免图像过饱和或背底值过低。

二、深度和厚度测量

激光扫描共聚焦显微镜通常用于测量深度,这是传统显微镜如光镜和电镜无法做到的。原子力扫描探针显微镜可以做到这一点,但它只能进行一维测量。激光扫描共聚焦显微镜在不同的精度下进行各种各样的测量,可以精确测量表面上不同位置的相对高度。固体或液体的三维空间的测量精度取决于系统的分辨率,在轴向不超过 $0.5\mu\text{m}$,轴向分辨率与数值孔径(NA)有关,必须使用数值孔径最大的物镜。

进行深度测量通常要考虑样品和介质折射率的影响,如果样品折射率和样品与物镜之间的光介质折射率相同,就不需要进行校正,而通过移动载玻片或物镜进行的深度测量就要进行校正。常用的折射率如下:①标本使用盖玻片用油镜观察,折射率 $n=1.5$;②通过反射光观察干花粉, $n=1$;③活体标本用水浸物镜观察,使用或不使用盖玻片, $n=1.3$ 。

以上任何一种情况下测量结果都要进行校正:在①中使用了油镜,在②中因没有盖玻片必须对物镜进行校准,在③中使用水浸物镜,因为盖玻片对整个样品产生一个平行相等的位移,所以有无盖玻片不影响测量结果。但是,如果物镜选择和光介质不相符合,图像质量将会变差,轴向和侧向分辨率都会下降,这是由于物镜球面像差引起,只能通过工作距离和光介质来进行补偿校正。

生物显微镜的物镜主要用于有盖玻片的标本,样本浸在折射率为 1.5 左右的光介质中,从盖玻片上表面到标本的距离应当是 0.17 mm ,这一距离标在物镜上,在这一工作距离上可以得到很好的校正像,但是相对深度测量改变了物镜周围光介质的折射率和样本浸泡液的折射率,所以对测量结果必须进行校正。图 3-2 是其原理草图,根据 Snell 的折射定律,从标本发出的光线经过盖玻片上表面时发生折射,光线好像是沿虚线方向发出,正确的测量结果应该是显示的测量结果乘以浸泡液对空气的折射率 1.5。

在理论上,浸泡在水中的标本不能用普通物镜观察,但在实际中用普通物镜观察时,可在盖玻片上表面下 0.2 mm 附近成像,然后将测量的深度乘以水的折射率 1.3 进行校正,即可得到正确数据。一般情况下建议使用水浸物镜,它不需要任何校正,也不存在像差。不能用油镜观察测量水溶性介质的深度和厚度,它会严重影响成像质量,甚至使测量结果不可信。

(一) 表面高度的测量

激光扫描共聚焦显微镜可以精确测量一个表面的高低变化,通过表面的垂直 X-Z 切面扫描可以得到线性轮廓图或通过一系列的光学切面扫描得到标本全貌图。显微镜的平面分辨率高于它的垂直分辨率,两个平面之间的间隔距离与最后合成的像大小一致。

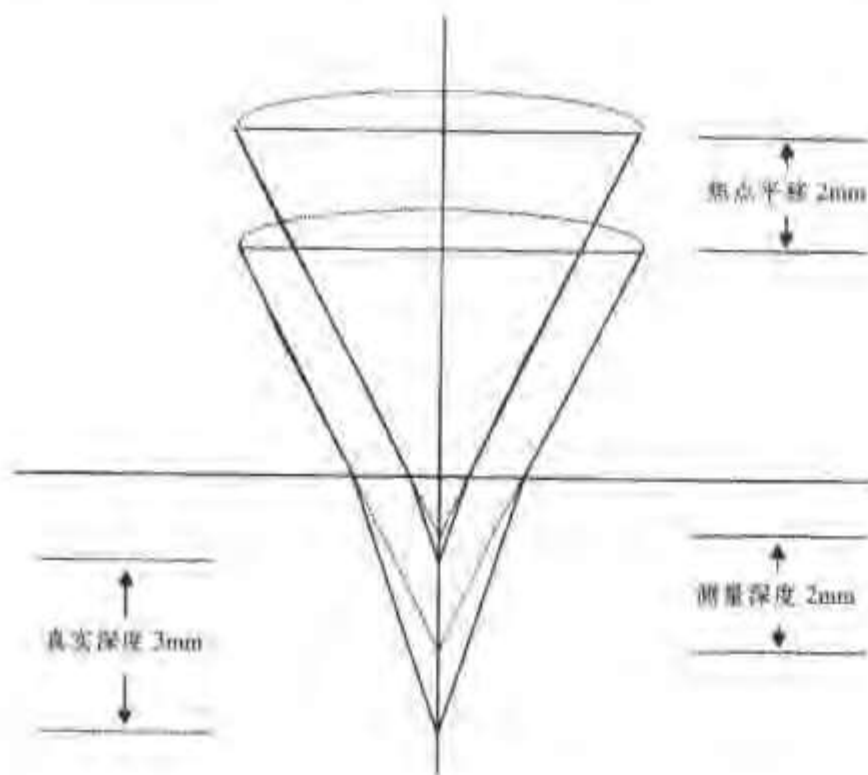


图 3-2 使用普通物镜和封片标本时，真实深度和测量深度的关系

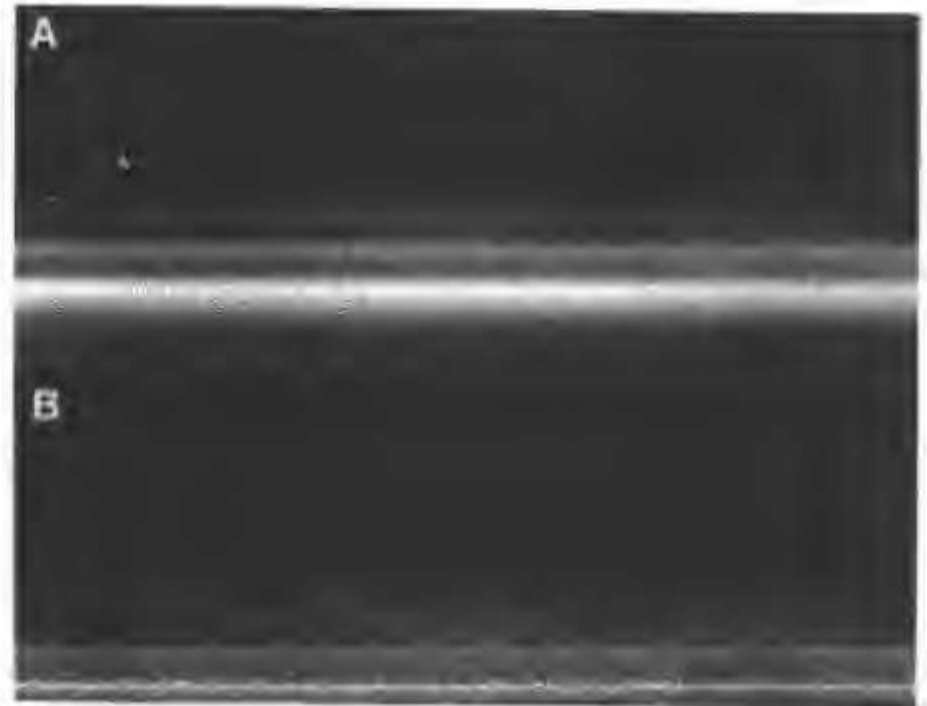


图 3-3 一种硅底质上有 $3\mu\text{m}$ 的 SiO_2 层，通过该样品进行的 X-Z 轴切面图像。在氧化物上方为一薄层油。在原始图像中 (A)，尽管每一层表面的真实位置都是该层的最亮部分，但用肉眼分辨并不清楚，因此无法进行层厚度的测量，经过 5 次弱化运算后，保留了峰值强度，使每层真正的位置清晰可见 (B)

合成数据（如 X-Z 切片图像、三维结构图）初看起来好像不是很好，表面图像被拉伸，深度图像模糊不清，测量似乎无法实现（图 3-3A）。然而亮度线条的最大亮度值有非常精确的位置，这可以直接用于测量或经过不同的图像处理方法进行测量。锐化或弱化方法可以产生一个像素宽度的深度梯度（图 3-3B）。有些系统将此功能作为软件的标准配置，提供的免费软件不但可以提取表面图还可以进行曲线插入处理得到比像素更小的精度。另一功能是图像压缩，此功能对彩色图像效果显著，根据输出图像的亮度绘制出最亮像素点的深度。

（二）厚度测量

测量细胞或类似结构厚度的最简单方法是进行 X-Z 扫描或 X-Z 多重切片。将细胞边界进行标记，那么最亮点即为细胞最表面的位置，进行必要校正后，就可直接测得样品厚度大小。如果待测样品各部分都被标记，那么要确定样品的边界就非常困难，通常最好的近似估计是取背底和亮点的中间点，可以证明在标本和周围介质没有折射的情况下这一方法是合理的。

在进行测量时要时刻牢记折射率对测量结果的影响，表面结构和相对深度的测量精度比深度测量的分辨率高，整体标记的样品测量精度较低。

三、长度、面积和体积的测量

（一）二维测量

由于图像以数字信息储存，使各种测量变得非常简单。大多数显微镜软件都有图形分割功能、面积计算功能、长度计算功能。复杂的测量需要将图形文件传给专门的图像处理软件进行测量。大多数显微镜软件都有标准的文件输出接口，图像处理软件包可以直接读取共聚焦显微镜的数据。

（二）表面面积和体积

使用共聚焦数据资料可以进一步计算指定区域的体积（在垂直方向上要做必要的校正），Bio-Rad 提供的 Lasersnap 软件，3D 分析软件如 Voxblast 和 VoxelView 都有设置体密度和阈值的功能，可以容易地得到数据结果。但在结构复杂的情况下尽量将所选区域分成独立的几层分别进行测量。表面的体密度计算与实际面积的计算不同。有些 3D 软件将面积资料应用于 3D 测量。有两种选择方案：①将标本形状近似成常见的标准形体（正方体，椭圆体）然后估计它们的面积；②采用如下的体视学方法。在生物学中

经常要对生物样品进行体积和表面积等参数的测定, 体视学可以提供相应的处理方法和计算方法。下面介绍两个非常有用的简单计算公式。

$$V_v = A_A$$

公式表明, 样本某一部分的体积密度 V_v 等于该部分的面积密度 A_A 。激光扫描共聚焦显微镜系统软件可以对采集的图像按照灰度或画线进行分割, 并计算其面积, 这样就可以精确计算出选定区域的体积。

$$S_v = (4/\pi) L_A$$

公式表明, 单位体积内细胞的表面积 S_v 等于切片单位面积内细胞的切面周长 L_A 乘以 $4/\pi$ 。以上两个公式用于标本无方向性随机切片观察; 如果标本具有方向性和不均匀, 切片时要注意方向, 使切片均等地包括标本的不同部分。为了避免偏差, 最好将标本分成网格状, 再根据坐标进行连续采图。

长度和面积测量是最基本的图像处理功能, 通过相应的图像处理软件很容易实现。体积的测量在概念上比较简单, 但却需要很多的技术方法或 3D 图像分析软件。3D 表面面积的测量需要专业软件, 而体视学是一种较好的处理方法。

四、荧光强度的测量

要对荧光的强度(亮度)进行绝对测量是非常困难的, 但相对亮度的测量却比较简单。激光扫描共聚焦显微镜是测量细胞内指定区域亮度的主要仪器, 它可以测量某一细胞器的总体亮度。荧光染料的衰减是一个非常重要的技术参数, 在实验过程中尽量避免染料的过快衰减。

(一) 线性校准

在进行测量前必须用全色滤色镜对相应系统进行线性校准。如果用相同的 PMT 作为荧光探测器, 控制激光输入功率, 直接可以用全色滤色镜进行测试。Bio-Rad MRC 1024 有 1%、3%、30% 和 100% 四档功率调节, 可以使校准后的图像效果最佳。在理想状态下探测器对任一波长的光都有相同的线性关系, 应用任何激光器都可得到满意的图像。在实际中探测器对不同波长的光灵敏度不同, 必须进行校准和修正。

如果探测器是一个独立的系统, 必须用荧光样品进行校准。将全色滤光镜放到激光光路中, 一定要保证在最大亮度时荧光染料未达到饱和, 否则将会影响探测器的线性转换关系。用几个不同的荧光染料稀释度可以检测探测器的输出是否与浓度成线性关系。另外有一种不易衰退的荧光塑料纸, 可用于上述的测试。

通常将一系列的滤色镜放在探测器前方的光路中进行校准。Bio-Rad MRC 500/600 提供有单通道滤色镜, 可以很容易的进行校准; 有些显微镜还将放置滤色镜的位置在光路中标出来。Kodak 还专卖可以随意切割成各种形状大小的明胶滤色片。

通过以上的操作, 可以得到被探测的光强与 PMT 输出的校准曲线, 在理想情况下它应该是直线, 在实际中最亮的像素点比系统的最大值至少低 10%。

(二) 测量

将最亮的样品放到显微镜上, 调节获取值以得到不超过饱和值的最大亮度。调好后, 固定获取值、PMT 电压和背底控制。如果它们都已被校准, 可将它们的数值记下并将其锁定保存(实验结束后再将其打开)。

通常需要做三种测量: 第一种, 测量未被标记的样本, 测得未标记显示的背底荧光值; 第二种, 测量选择标记的样本; 第三种, 测量不同的实验处理标本。选择性标记和实验处理标本的荧光量差别应该大于未能标记样本的背底荧光量, 这才是比较合理的实验结果。如果有必要可进行线性校正。

(三) 比率成像

有些荧光染料的激发或发射峰值的波长随着样本中某些离子浓度的变化而变化, 所以可用于 PH 值或其他离子的测定。图 3-4 是几组染料激发和荧光发射曲线图, 可以看出任何一条曲线都是不同的。原则上来说, 通过任意两个波长的强度测量, 都可以确定是与那一条曲线相吻合, 从而得到样本的离子浓

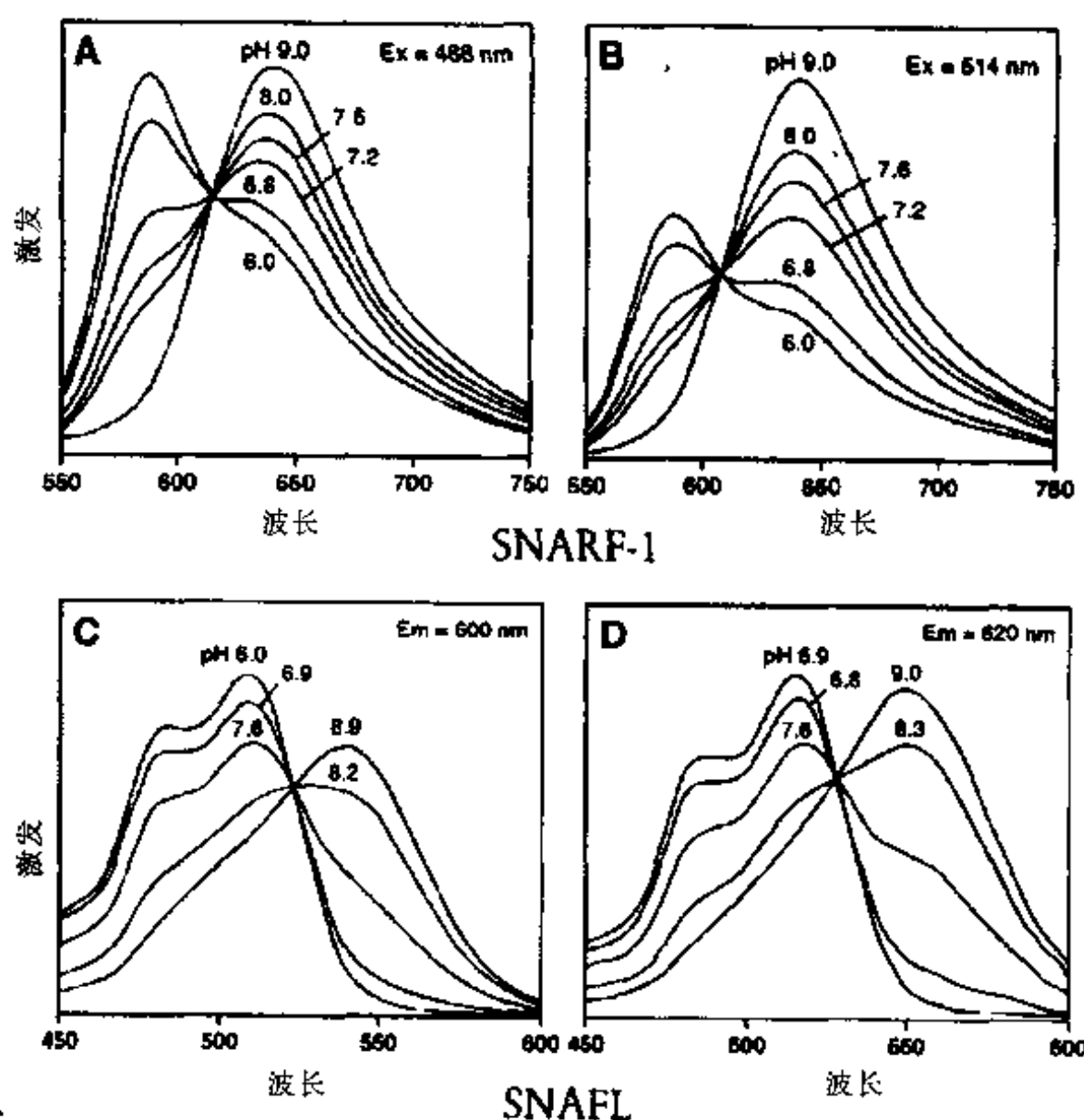


图 3-4 适合共聚焦显微镜检测的 pH 敏感性比率染料。A: 用 488nm 波长激发时, 在 pH 6.0~9.0 范围内羧基 SNARF-1 的发射曲线; B: 使用 514nm 波长激发时, 相应的发射曲线; C: 在 600nm 发射波长测定时, 在 pH 6.0~8.9 范围内羧基 SNAFL-1 的激发曲线; D: 在 620nm 发射波长测定时, 在 pH 6.0~8.9 范围内羧基 SNAFL-1 的激发曲线。两者都适合使用 488nm 和 568nm 的共聚焦系统进行比率测量

度。在实际中由于信噪比很低, 无法满足精度的要求, 除非选择的两个测试点差别很大。通常激光扫描共聚焦显微镜的信噪比小于 CCD 的信噪比。在 1s 曝光时间内得到 768×512 像素的图像, 对 CCD 来说, 样品的每一点都有 1s 的取样时间, 而激光扫描共聚焦显微镜只有 2.5 μ s, 但这可通过在焦平面上取样而抵消, 所以, 测量并没有因不同层面上的细胞或染料面影响测量效果。

比率测量的最大优点是通过两个波长的强度之比来确定离子的浓度 (绝对强度并不重要)。它不受染料浓度、负载是否均匀、是否分散在细胞内和染料是否衰退等因素的影响, 然而它会受到背底荧光的影响, 要尽量减小荧光发射。由于激光扫描共聚焦显微镜大多是 8 位图像存储, 动态范围受到一定的限制, 所以一定要保证染料最高浓度的光强在任何波长下不达到其饱和亮度。

在大视野比较成像中经常使用激发比率。钙离子测量选用 fura-2 染料, 激发波长 340 nm 和 380 nm, 发射滤光镜 510 nm, 激光扫描共聚焦显微镜没有固定波长的激光光源。实际上激光扫描共聚焦显微镜的激发波长范围很有限, 比汞光源更易进行限制, 所以, 发射率的测量更有意义。几乎所有的共聚焦显微镜都有两个或更多的 PMT, 多个图像可以同时进行采集。

有时用多种染料进行比较成像, 如用 fura 和 fluo-3 测量钙离子浓度, 激发波长 488 nm, 通过 520 nm 和 650 nm 得到比率图像。这种方法的缺点是很难保证两种染料在所有的细胞中有相同的负载。一般首选单标, 多标技术现在也有了很大的发展。测量发射率的基本方法是同时记录在不同波长下的图像, 扣除背底即可得到两个图像的比较图像, 这一过程软件自动完成。如 Bio-Rad 的共聚焦显微镜在扫描的同时就完成了以上的处理过程, 两个原始图像和比率图像实时显示, 同时也显示图像上多个点的离子浓度

随时间的变化曲线。

必须认真选择测试波长。如图 3-4, SNARF-1 在氩离子激光器, 激发波长为 514 nm 有双通道滤色片的情况下效果最好, 它不适合于双通道的氩/氩激光器, 如 Bio-Rad 的 D₁/D₂ 或 A₁/A₂。由于在 550 nm 荧光很弱, 小 pH 值的峰值在 580 nm 左右, 很接近激发波长 568 nm, 从而使其叠加。专为氩离子激光器 A₁/A₂ 设计的 BARRIER 和两色滤光片用在激发波长为 488 nm 的氩/氩激光器上效果很好, 这样就可不必购买滤色片组件。

一般采集两个图像便可得到激发率。发射光线由软件控制选择, 使得转换时间很短。在早期或简单的系统中, 滤色片由手工更换, 要进行实时测量就非常困难。如果激光器的标称参数非常准确, 那么就可以得到精确的测量。如图 3-4 显示的样品羧基 SNAFL-1 通过氩/氩激光器的 488 nm 和 568 nm 波长得到效果非常好的比率图像。

要得到精确的数据输出, 必须对比率成像进行精确的校准。由于参数和荧光特性会受到细胞内环境的影响, 在体外无法进行校准, 必须在细胞系统的测试中进行校准。离子浓度的测量原理是将离子浓度转换成可以读取的数值或一系列数据。EGTA 可以精确测得钙离子浓度, 尼日利亚菌素可用于 pH 值的校准, 通过计算机软件可以实时跟踪显示离子浓度。

总之, 进行荧光强度测量时, 应首先检测系统的线性, 对系统进行线性校准, 设定合理的获取率和背底水平, 对选择滤色片和实验条件然后进行样品测定。

第四章 图像的三维重建

在本章中将介绍一种简单的 3D 成像方法，立体幻灯片和图像用 Microsoft PowerPoint97 与 CorelDraw8 制作。使用平视图和交叉视图进行 3D 视图重建，在进行图像处理过程中假设共聚焦显微镜的立体对应图像序列已经被采集。

制作书面图像或幻灯就可能要对图像进行平移或旋转。如果将用于书面打印的图像序列用于投影，图像就会变得拉伸、扭曲，使观众难以理解。这是由距离畸变现象引起，当从远距离观察时 Z 轴方向距离被拉长。投影图像的平移量或旋转角一般可以定为书面图像的一半，也可以根据具体图像和位置情况自己选定平移量或旋转角，以达到最佳的立体效果。可以通过公式计算 3D 最佳效果的平移量或旋转角。

要得到好的 3D 图像，一定要确保立体序列图像相对应的图像有相同的亮度、对比度、反差、放大倍数和相同的锐化设置。

3D 体视图有两种最基本的观察方法，一种是不同的图像显示不同的颜色进行观察（如 anaglyphs of red-green/blue 红绿蓝浮雕法，producing monochrome 3D images 单色 3D 图像法），另一方法是将图像重叠显示。后一方法较为常用，它可以提供独立的组成图像，还可以显示全色 3D 图像，避免了红/绿视觉问题。

可以用体视观察仪观察 3D 图像，它可以使眼睛将对应的体视序列图合并成像，也可以通过自己眼睛的平视/交叉观察将图像合并。由于体视观察仪不普及，所以后一种观察法是常用方法。

在本章中介绍如何使用 Microsoft PowerPoint 97 制作 3D 幻灯，用 CorelDraw 8 制作 3D 出版图像。使用以上方法必须有将显示器上的序列图像通过眼睛的交叉观察进行合并的能力。如果对相关的观察方法不很熟悉，请阅读相关部分，熟练掌握共聚焦显微镜 3D 图像的基本观察方法。

一、材料

(1) 共聚焦显微镜采集的原始序列图。

(2) 计算机系统要求 Microsoft PowerPoint 97 和 CorelDraw 8（或其他同类软件），幻灯制作机或彩色打印机。

(3) 三维体视学图像观察仪。

(4) 立体投影系统，包括放在调节架上的两台投影仪、白色屏幕、两个偏光镜（投影仪）、3D 偏振眼镜、3D 观察仪（双投影）。

(5) 附件 体视学 3D 观察仪、小型荧光光源、35 mm 幻灯架、调节 3D 胶片的工具套件。

二、方法

（一）体视学图像观察

进行体视学图像观察的技巧就是用两个眼睛分别观察两个图像，然后在脑子中形成 3D 图像。原理似乎很简单，但要获得满意的 3D 视图效果并不容易，必须进行反复耐心的练习。下面介绍两种基本的观察方法，以图 4-1 为例。

1. 视线交叉法 (cross-eyed method) 视线交叉法是将眼睛聚焦到很近的一个点上（如鼻尖）来

观察体视图,这样右眼就聚焦到左边的图像上,左眼聚焦到右边的图像上,如果两个图像聚焦就可以融合成一个中间图像(图4-1),在头脑中便形成3D图像。下面做一个实验,将你的食指放到图4-1A上,然后渐渐向你的鼻尖移动,同时观察背景图像的变化。你会发现如图4-1的效果,出现三个图像,中间的图像就是视觉合成图像。在手指离鼻尖4英寸附近有一个点,手指和中间像都不能聚焦,中间的图像就是体视图的合成图像。慢慢调节手指的位置可得到3D图像效果。将头斜向任一侧观察同一垂直位置的两个圆,如果达到正确的体视学效果,这两个圆应该合并成一个圆。将眼睛聚焦到中间图像上(图4-1),放松眼睛,耐心的坚持。通过训练大脑将会习惯这种观察方法,最后可以观察到三维立体图像。

视线交叉法是最容易学、最有用的体视观察方法,该章中的体视图都可用它进行观察。然而,也有许多3D观察者习惯使用平行视线法,所以通常发表的体视图是用平行视线法观察的。也可通过体视学眼镜仔细观察公开发表的体视学图像。

2. 平行视线法(parallel-eyed method) 平行视线法是将眼睛聚焦到远距离的物体上,使两只眼睛视线分开,这一方法主要用于点状立体图和版面立体图,该法比视线交叉法掌握难,要求严。将彩色平面图放在你的眼前,先将眼睛聚焦到很远的物体上,然后在保持两眼睛视线分开状态下,把视线移到平面立体图上。如同视线交叉法一样,你可以看到三个图,中间的图就是合成的图。该法掌握较难,必须有耐心地反复练习。

注意:用平行视线法观察图时会得到一个反向的图像,在透明样品中更为明显,可以产生一个非自然的虚像。

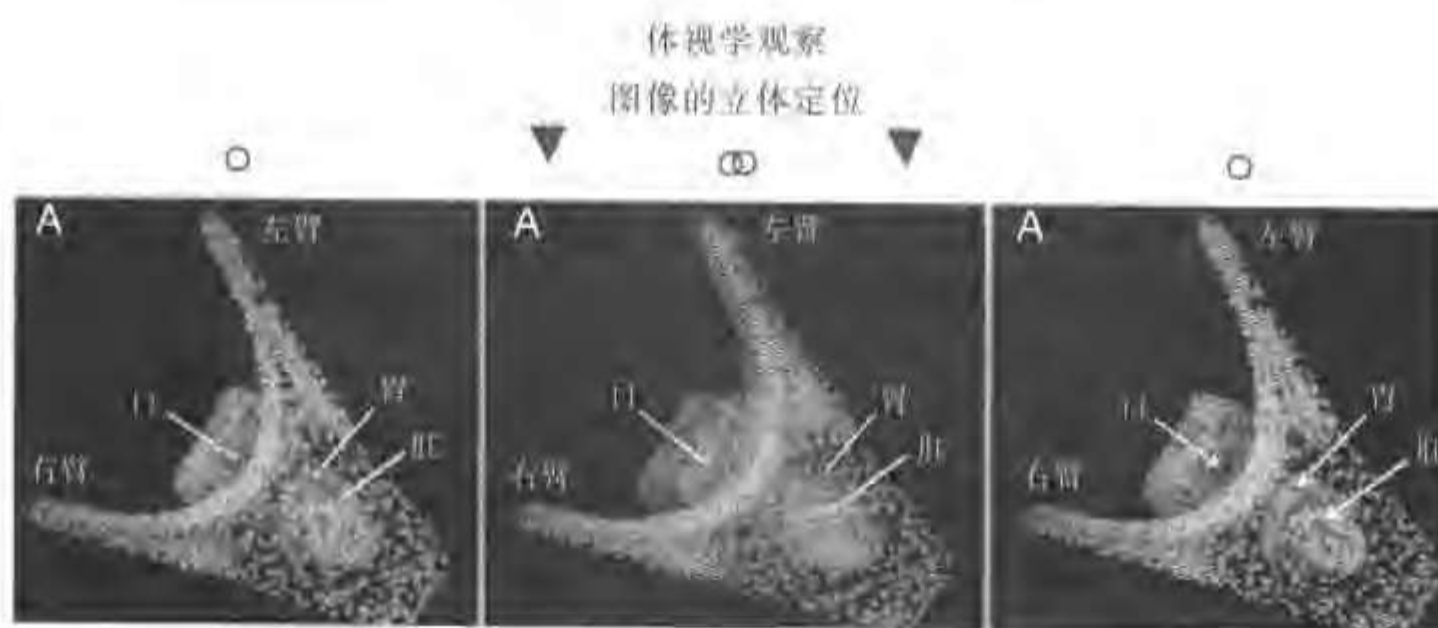


图4-1 视线交叉法从A图的两幅图像(左右两侧)叠加后得到的立体图像(中间)。图上方的小圆圈被用来获得正确的立体视图,目的是将两个圆圈在中间重合产生立体图像

(二) 三维图像的构建

以下介绍的构造三维图像方法过程也可用于同类型的其他软件。制作幻灯首先将正常页面放大一倍(宽:高=3:1),再调整体视图。如果是制作共聚焦图像,要将背底调到黑色,对应共聚焦的无标记背底。也可以通过阈值设置功能调节图像的黑色背底。这样可以避免3D图像出现可见的晕和模糊亮点。一定要对两个体视图进行完全相同的处理。用CorelDraw制作版面图像,首先根据需要设置图像页面大小,然后创建一个5英寸(1英寸=2.54厘米)的黑色方框作为图像背底。

由于平行视线法不能观察大于5英寸的体视图,而计算机显示器大小由11到17英寸,只能用视线交叉法观察显示器上的体视图。将右眼图像放在体视图的左侧(图4-2),于是右眼图像被插到doubled blid上(左平移或右旋转),在左半边调整位置,用同样的方法将左眼图像调整到右半边(图4-3),位置确定好后对图像进行剪切,去掉不需要的区域。如果进行版面体视图制作,由于大小不能超过5英寸,所以要准确选取视野。剪切后的图像还要进行定位和缩放,使其充满打印区域。

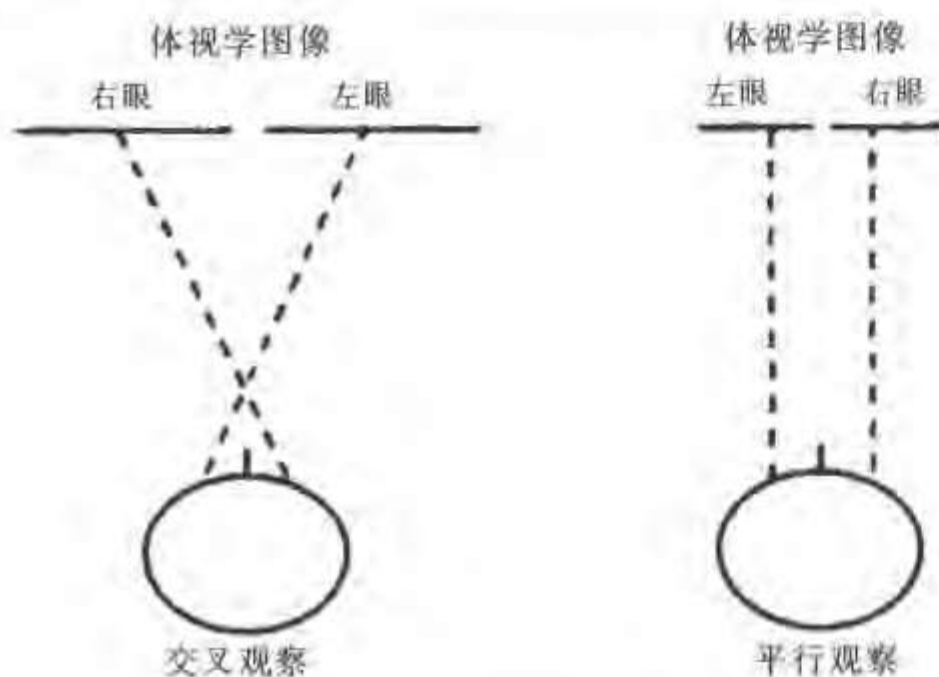


图 4-2 体视学观察法



图 4-3 插入立体图像后，PowerPoint 的图解 注意使用正常 35mm 幻灯片模式，宽度增加一倍。左眼图像放置在右侧，右眼图像放置在左侧

通过校准 (align) 功能进行校准。

将标记符号放在要求标记的位置上，选定一个文本框。在用交叉视线法观察 3D 图像的同时，用浮标左右调节选定的文本框。靠近时标记远离观察者，分开时标记靠近观察者。有时标记会影响图像的效果，如图 4-5 中的胃将图像分开，所以在放置标记时位置受到一定的限制，此时最好用 3D 箭头指向标记的位置（图 4-7A）。

3D 箭头的产生方法是，先在左侧框中画一个箭头将要标记的位置和标记说明连接起来，然后将箭头和标记同时复制到右侧图中相应的位置，这样就产生了平面箭头和标记（如图 4-6B）。要使其成为 3D 效果就要调整右侧箭头的大小，使左侧眼睛透视为空间箭头，同时要水平调节。减小右侧箭头的长度，3D 箭头将指向内（图 4-6A）；加长右侧箭头的长度，3D 箭头将指向外（图 4-6C）。在调节箭头长度时一定要微量调节，否则 3D 箭头很难观察到或是箭头过深过浅。

得到右箭头后在图像结构中和箭头空间中调节其位置，也可以用彩色显示图像。同样可以创建其他物体的 3D 图像效果，如昆虫、几何图形、圆、点等（图 4-7A）。可以绘制 3D 立体图像的应用程序（如 PowerPoint）都可通过上述方法对图像进行旋转或平移得到体视学图像。

要得到好的 3D 效果，必须对两个体视学图像进行水平对齐调整。首先选择 guides，用 ALT 键+鼠标移动一个图像，使两个图像的对应点在一个水平面上（图 4-5）。如果两个图像的放大倍数完全相同，两个图像所有的对应点都可以调整对应在一个水平面上；如果放大倍数不同，必须对某一个图像进行放大倍数调节，直到两个图像放大倍数相等为止，再用上述方法进行水平调节。

体视图调整好后，可将体视图移到体视窗口进行观察（图 4-4），窗口指显示图像的平面，即计算机屏幕。在每个图框中的中间和边上建立垂直坐标（图 4-5），这一坐标将能在体视观察中看到，并在窗口平面上精确显示，物体的最近点应当在坐标的后方（即左臂点）。调节物体位置，将两个图像靠近，3D 物体图像向窗后移动（即计算机屏幕后方），同理，将两个图像分开，3D 物体图像向窗前移动（即计算机屏幕前方）。

（三）三维 3D 体视学图像的标记

得到 3D 图像之后，可以根据需要进行标记。首先创建文本框将其移到想要标记的点附近，然后复制文本框将其移到右侧图像对应的位置上，确保两个文本框在一个水平面上。选择两个文本框

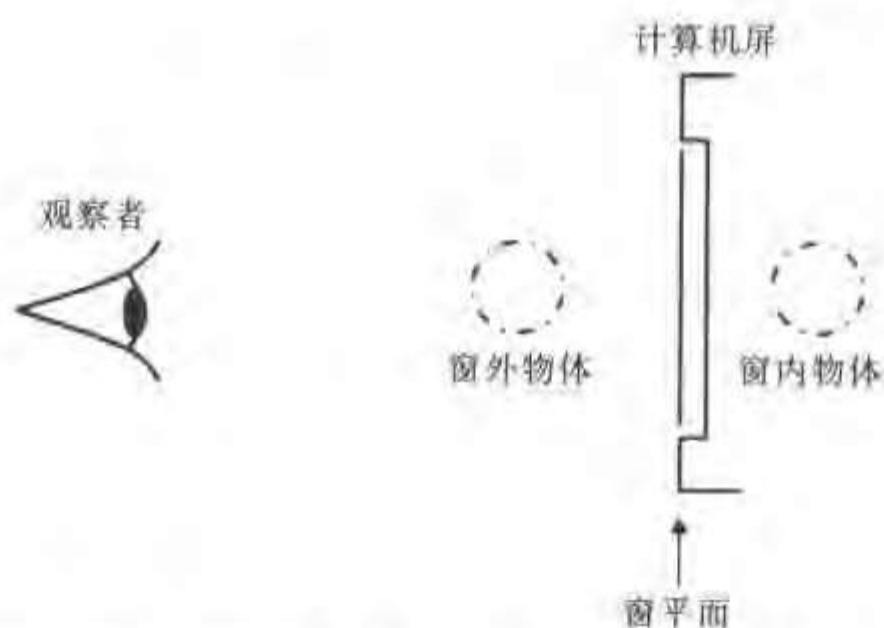


图 4-4 体视“窗口”模式图。如图 4-7B 显示，胚胎在窗口内，而插图在窗口外

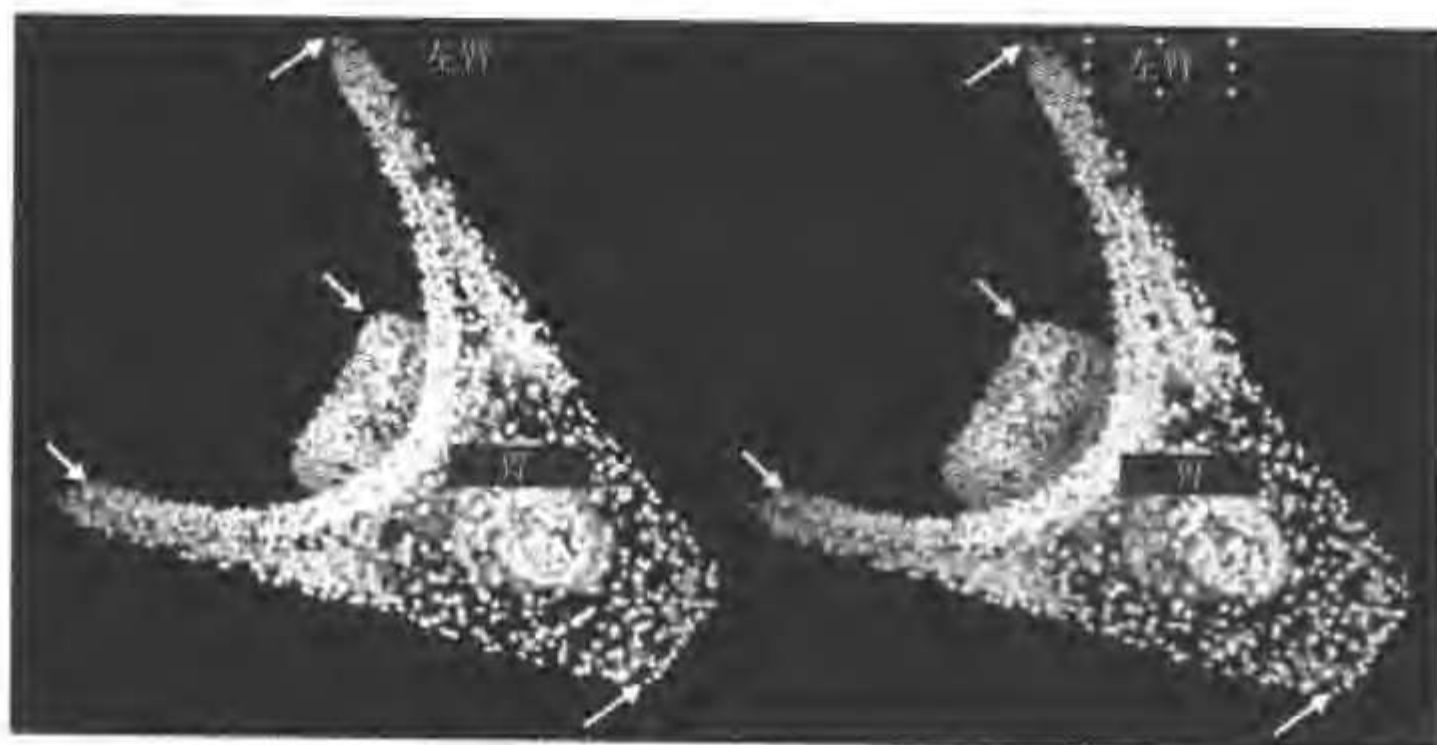


图 4-5 在 3D 图像中，立体图像对的排列和标记的放置。注意水平线用来校准两幅图中箭头所示各点的位置，纵线恰好位于每幅图的中央，在窗口平面的水平产生一个 3D 网格。胚胎的 3D 图像被放在该窗口的后面

（四）图像发表

1. 体视学幻灯制作 在 PowerPoint 经过体视学调整以后图像分为左右两组，并且保持箭头和标记位置不动。选择左侧全部图像进行合成，同样对右侧图像进行合成，可保证标记和箭头位置不动。

制作体视学幻灯，必须同时制作两组幻灯图像，这是因为在体视学投影时同时使用两个投影机，一台投影左侧图像，另一台投影右侧图像。打开显示窗口，创建 35mm 空白幻灯模板，背底设为黑色。在图像窗口中将左侧图像拷贝到剪贴板上，然后将其粘贴到空白模板上，用同样的方法对右侧图像进行幻灯制作。为了便于区分左右幻灯和观察方便，可以在幻灯的下脚标记出左右和简要说明。

由于两组图像在不同的幻灯上，必须在体视学窗口进行位置调节。首先确定最近点的位置（图 4-5 和图 4-7A 中的左臂尖），激活坐标调整左侧图像的位置，确定最近点的垂直坐标值，然后对右侧图像进行调整，保证对应点在同一水平线上。最后，用 PowerPoint 对幻灯进行反复放映，图像应该有很小的旋转，在垂直方向和水平方向没有跳动，最近的点保持不动。也可以在 100% zoom 下观察两个幻灯，用交叉视线法观察体视效果。注意右眼观察的幻灯放在左边。



图 4-6 3D 箭头。这些箭头在 PowerPoint 中创建，为成对图像，而后调整右侧箭头产生 3D 体视学效果。A：指向“窗口”内的箭头；B：指向“窗口”平面的箭头；C：指向“窗口”外的箭头。线条用来显示立体箭头对的相对大小和位置以及立体窗口平面

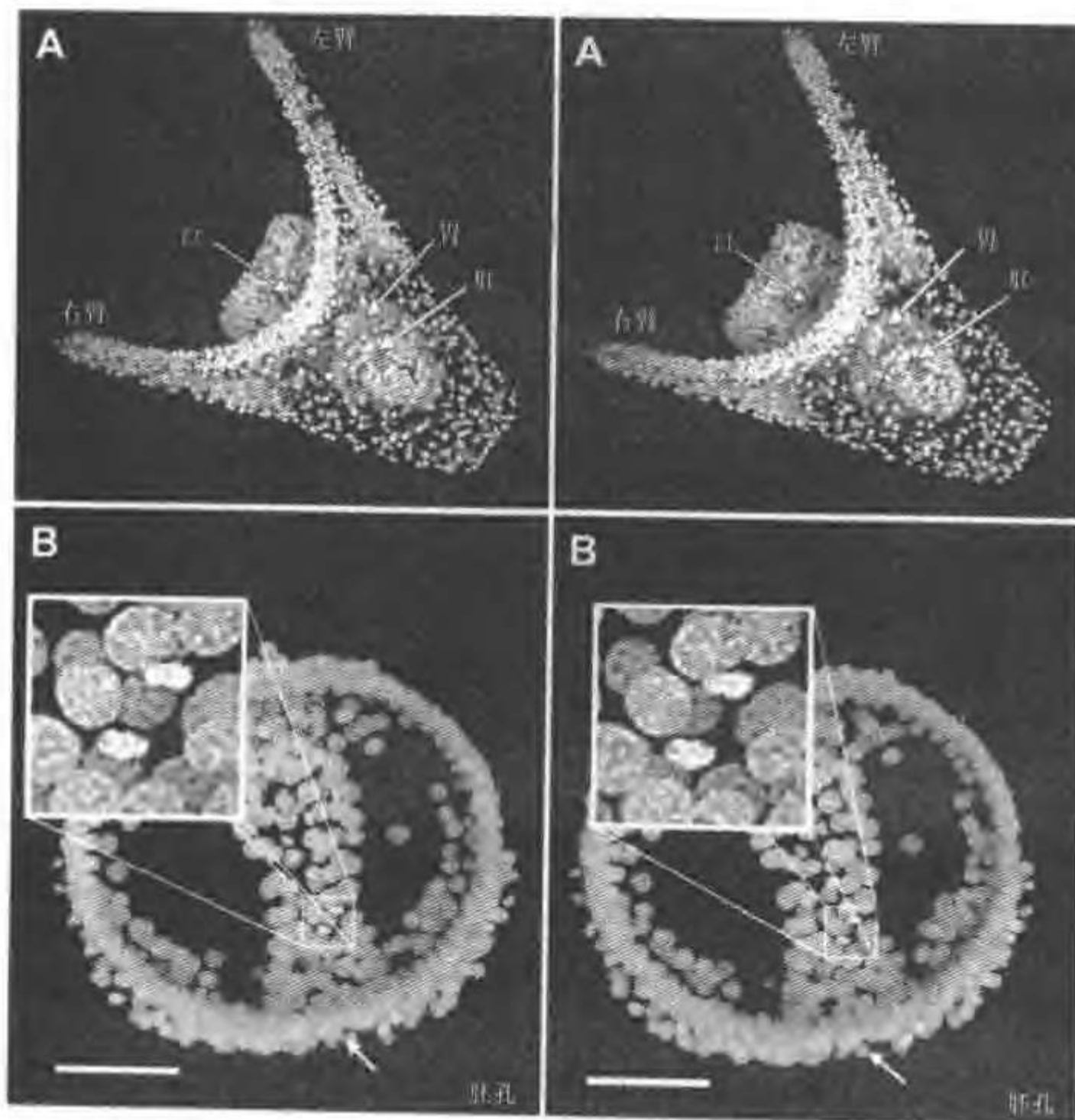


图 4-7 用 PowerPoint 制作的立体图像（来自海胆胚胎的一系列共聚焦光学切面）。A：用 3D 箭头和标记文字标记的几个胚胎解剖学结构。B：插图在立体“窗口”的外部，胚胎在窗口内部。平行视线观察的图像见彩图

如果厂家能提供幻灯片定位非常准确的幻灯装置,那么在调整幻灯时就可节省大量的时间。一般手工幻灯用玻璃幻灯架,而且要在体视学窗口进行3D图形调节。如果在窗口中调整幻灯片,两个粘贴图像之间的距离为0.5英寸。在Reel 3D Enterprises中有透明坐标系和幻灯粘贴说明。

2. 体视学图像的打印 如前所述,用相同的原理可以制作体视学打印图像。通常用平行视线法观察体视学图像,所以必须对用视线交叉法观察的图像进行对调(图4-2),并且两图像的距离不超过5英寸,两图像之间用白线隔开(彩图1)。

将体视学图像放到显示窗口,范围不要超过中心 ± 2.5 英寸。当两组图像远离时合成图像在屏内,靠近时合成图像在屏外。如果用视线交叉法观察用于平行视线法的体视图,就会看到反向的3D图像——幻视影像(用共聚焦图像很容易观察到幻视影像,它与SEM的体视学图像、彩图1C的3D图像或彩图不同)。如果物体看起来是在屏外,实际上它是在屏内(试着用两种方法观察图4-5)。通常打印的图像与窗口中显示的图像不完全相同,这时可以缩小图像尺寸大小,使图像在屏内。如果要图像细节,还要保证能观察到屏外图像(图4-7B,彩图1)。

(五) 三维图像的放映

1. 体视学幻灯放映 体视学幻灯放映机安装调试的详细说明请参阅有关资料,这里只作简要介绍。体视学幻灯放映需要两台幻灯机同时工作,将左右两组图像同时放映到一个屏幕上,两个图像必须完全重叠显示(水平和垂直)。在两个幻灯机的投影镜前各放置一个偏振片,使两个偏振方向互相垂直。观众戴上立体眼镜,通过调节可使左眼只能看到左视图,右眼只能看到右视图。立体眼镜和偏振片可浏览相关公司网站进行查询订购。

2. 用体视镜观察体视学图像 包括成对35mm 3D幻灯片观察仪的其他体视镜也可进行幻灯片观察,它主要用在没有幻灯机的会议介绍上,由于观察距离较近,容易产生图像畸变(如立体效果变差,图像模糊等)。

对视线交叉法和平行视线法不熟悉的观察者可以使用体视眼镜。由于塑料体视眼镜价格较低,一般较常用,但图像质量较差。另外介绍一种常用的体视学观察技巧,将一张20cm大小的硬卡片垂直放到两个图之间。鼻尖顶着卡片上缘,两只眼睛从卡片上缘往下看,最后将两只眼睛分别聚焦到两个图像上,该方法对初学者来说是训练平行视线法最简单有效的方法。

参阅有关PowerPoint和CorelDraw书籍资料。

相关网址:

<http://www.stereoscopy.com>

<http://www.stereoscopy.com/reel3d/index.html>

<http://www.stereoscopy.com/3d-info/index.html>

<http://www.lhup.edu/simanek/3d/3dpage.html>

<http://www.cs.ubc.ca/spider/ladic/confocal.html>

<ftp://ftp.genetics.bio-rad.com>

<http://www.A-G-E.com>

第五章 图像的信息管理

成像的方法很多,无论是采用电影、电视技术,还是数字采集方法,关键要能够较方便地分类和检索成像后的信息和图像。现代成像技术能够产生大量各种内容的二维或三维图像,共聚焦显微镜工作者遇到的主要问题包括:①各种图像如何采集;②图像保存在哪里;③图像是什么样的;④图像有那些主要特征;⑤如何跟踪这些图像的变化。共聚焦显微图像的本质是数字图像,因此我们自然考虑到用基于计算机的数据库技术来对信息进行存贮、分类和检索。本章涉及上面的各种问题以及应用一些简单数据库来维护、管理共聚焦图像数据库文件中的信息和图像。

本章简单介绍几种有用的成本低的数据库工具,它们已成功地应用于共聚焦成像。有关数据库更详细知识可参阅计算机数据库书籍,可以从以下网站下载这部分内容:<http://www.cajel.ucsd.edu>。共聚焦显微镜工作者从中还会发现,使用 NIH-Image 可以转换不同计算机系统的文件,也可以对共聚焦图像做后处理。

数据库是以有序的方式存贮在计算机内的信息的集合,其设计结构有助于数据采集和进行逻辑结构化信息查询和检索。数据库已广泛应用于政府、医院、工业及实验室,每个科学工作者都离不开数据库。例如,Medline 数据库、电话公司指南、书的目录或索引表等。

一个数据库文件包括一组记录,每条记录包含一幅图像或一系列图像的信息。一条记录由多个字段组成,反映了信息的不同归类,例如,使用的显微镜型号、放大倍数,使用的激光、染料,文件存贮位置以及动物、切面、图像数据等等。

数据库中要存贮最重要的信息,包括图像的特征、采集图像的方法以及可供快速浏览并从中选择特定图像的图像集合。一个好的数据库还应有集成图像采集软件用于共聚焦显微镜,并且这种数据库能够独立于共聚焦显微镜,在其他计算机上使用。虽然有的共聚焦显微镜系统可以存贮这些信息,如 Zeiss LSM510,但该系统程序不是独立的,当脱离了特定的 LSCM 就无法使用。

一、数据库的类型

(一) 传统的基于文件的数据库,不能显示图像

传统的基于文本的数据库,能够存贮采集图像的有关信息,如采集的方式、文件名、日期、注释以及显微镜图像的缩略图。有许多便宜的程序,可以实现这一目的,如 FileMaker Pro (FileMake 公司) 和 Access (微软公司)。这些软件同时显示多幅图像的能力非常有限,但这种类型的数据库特别适用于查找指定的文本信息,本章将在后面更详细的讲述这种数据库。这些程序用在最初采集共聚焦显微镜图像时最有效,可以给每条纪录加入额外的注释。例如 FileMake Pro 模板,这个模板的格式比较容易构建。

个别的字段可以用下拉式菜单显示一组预设的值,如切片的各种切面。这种方式有助于输入数据,并建立一种严格的协议保证所有需要的信息正确记录下来。

一个程序(如 FileMake Pro)的最有用的特征之一就是很容易以不同的形式显示数据,用户可以方便的修改版面,并且快速从一种版面切换到另一版面,以便集中了解数据中的某一细节。用户可以生成一个版面,提供总结式报表、采集日期、切面、样本、染料或其他特征。

这种类型的数据库主要基于文本内容,当然记录中也可以有图像字段。但是,像 FaileMake Pro 这样

的程序本身不适合进行大量图像的获取和存贮。为了限制存贮空间,以便存贮大量的图像文件,原始图像必须变换成小的“缩略图”。

(二) 图像数据库

图像数据库的设计允许显示大量的缩略图,并能够根据视觉内容而非文字描述快速地找到需要的图像,这种程序可以自动扫描磁盘,找到特定类型的图像文件,如 Bio-Rad*.PIC 文件,生成缩略图,并存贮缩略图、文件大小、文件位置及格式,以及与原图有关的各种参数。用户可以打开多个文件观看缩略图图像集锦,选中一个文件可以放大并观察细节,还可以基于关键字、日期、文件名查找需要的文件。但是,在存贮诸如数据采集的方法、图像的文字描述、与其他图像关系、图像内容的分析理解等详细信息方面,图像数据库也受到限制。所有这些信息一般只保存在一个有限长度的字段中,不能像第一种数据库那样,根据文本描述的特征进行查询。这种类型的代表产品包括 Cumulus4.0 (Canto 软件)、Portfolio3.0 (Extensis 公司) 和 ThumbsPlus3.1 (Cerious 软件),虽然这 3 种程序操作上比较相似,但某些方面也有较大区别。

在各种数据库程序中,有些较低成本的程序采用 Photo CD 存贮方式,这些程序虽达不到我们需要的功能,但有助于初学者刚开始使用和熟悉这种数据库类型的程序。

二、图像数据的存储

共聚焦显微镜的生产商提供一些软件,除了采集和存储图像,也保存有限量的信息,如采集方式、图像注释,这种信息与图像可以保存在同一个文件中,也可保存在一个相关的文件中。

Bio-Rad 把一些基本信息与图像存在一个文件中;Leica 将这些信息存于单独的一个文本文件中,文件名相同,但增加 3 个字母表明它所包含的信息内容。用 Leica 的软件查看图像时,对应的文本内容也一并显示,但如果用其他看图软件,如 Adobe Photoshop 就不能看到相应的文本信息。Olympus (Fluo View) 将这些信息保存在 TIF 格式文件中的特定区域中,当打开整个文件就可以使用这些信息。虽然采集参数会自动保存在文件中,但多数用户都不作相关的注释,如材料性质、结果分析、其他相关实验等,也许他们打算实验结束后再写或者认为文件本身能反映出来,我们建议使用者填写相关注释,便于日后查阅。

原始文件中的数据可能包括多种信息,关于放大倍数、增益、偏差、分辨率(微米/像素)、滤镜、颜色表(LUT)、积聚方式(kalman, 积聚峰)以及一些有限的文字信息。但是,这些信息只有当单独打开每个文件时才有效,没有一种简单的办法同时查看所有图像的信息,因而,用户也无法轻易而迅速地查找需要的信息,比如想查找所有被某抗体染色的图像或查找某种特定的标本。

已经开发出各种软件(一种用来进行文件格式转换软件,如从 Bio-Rad 到 Photoshop)用来将 Bio-Rad、Leica、Zeiss 及 Olympus 文件转换成更通用的平台(Mac、PC 和 SGI)和更一般的文件格式(photoshop、NIH-Image),但是在变换中却失去了采集信息和参数。Photoshop 和 NIH-Image 不允许在文件中包含文本信息,因此,当把文件转换成这两种程序之一时,有关信息无法保留在文件中,虽然可以从原始文件中提取这些信息,但这种办法效率很低。

目前各种共聚焦显微镜的生产商不愿意用一种标准文件格式来解决这一问题,不同的共聚焦显微镜的生产商选择用不同的数据文件格式。

这种文件格式因一些因素变化而变化:①是否将采集参数和用户注释与图像数据本身保存在同一个文件中;②是否图像文件中也包含采集参数、注释、标尺。

图像的特征(单、双或三标记,单标记 Z-系列、双标记 Z-系列、三标记 Z-系列等)建议保存在一个单独的数据库文件中。

处理信息的办法就是将信息记录在传统数据库中,由许多条含多字段的记录组成,每条记录用来存贮一幅图像信息,而每个字段包含了与每条记录有关信息的不同类别。例如,描述文件内容的标题、透

镜、滤镜、切面、染色等等。用户还可以根据它们个人的需要和偏爱给记录增加字段。现代数据库软件也提供了在每条记录中存贮一幅或多幅图像的方法,还提供多种数据显示格式、数据排序、查找特定信息等功能。一个好的数据库模型还允许导入一些已有记录,并提示用户加入需要的信息。

三、数据库的建立

(一) 基于文本的数据库

使用 FileMake Pro 或 Microsoft Access 用户应该生成一个模板,反映用户认为重要的信息类型。

通常产生一幅图像比较容易,而给它取个文件名却有点难。要使用 DOS 的命令规则 (8+3=文件名.扩展名) 就特别麻烦,但使用 Mac 或 Windows NT 系统的长文件名方式也会令人烦恼。如果过分依靠文件名来反映内容会带来严重的潜在缺点。如果用户从动物 NR12345 的外周视网膜采集了一个三标记免疫荧光染色的切片,取 725 放大倍数,且只存储在少数的文件中,那么就可以取一些与激发 (spur) 时间有关的文件名,如 "TriplRet.tif",并有望记住使用的文件名包含了什么内容。如果每个月只采集一幅图像,上述办法还可行,但是,当用户处理的图像越来越多时,这种命名方式就特别费事。文件名也可以不特指什么,如 Mx4bixi.tif,这个办法也不太好。但如果碰到一组易混淆的名字,就最好考虑换一种表示方式。每个人必须找到自己的处理策略,目前的解决办法倾向于基于计算机的数据库,但也不能解决所有问题。

(二) 用数据库给文件命名

数据库程序可以给每幅图像自动分配一个序列号作为额外的一个字段,也可以产生一个正式文件名(例如, BR805689.TIF)或者可以人为选择一个有意义的文件名标题,如 CalRet01.tif 表示该图像是用 calretinin 染色,并且是一系列图像的第一幅。

图像标题:是一种更长的有更多可理解内容的标题,能传达图像文件的更多信息,例如“用 calbindin 染色的猴子视网膜,Z轴为横截轴”。

一些字段由下拉列表组成,列出常用的值,这些字段可以是:切面(截面、水平面、矢状面)、物镜(10×、20×、Plan Apo 40×油镜等)、荧光染料、孔直径、激光能量。有些信息也许很多余,但在数据库中可备随时检索。另外,用户可以加入原共聚焦图像的缩略图,以帮助指示文件的内容。

在记录中最有价值的字段,应包括对图像的详细描述或注释、与所做工作的关系、制备方法中的特殊之处、图像的特殊之处、从图像中得到的结论。也可以加入有关技术说明,如采集数据时的错误、样品质量的不规则性等。这种重要的功能要求数据库程序支持可变长字段,在 FileMake Pro 中,所有字段都是可变长的,并可以建立索引,因而可以查询特定的短语或单词。许多数据库,包括 Microsoft Access 97 要求用户定义每一个字段的长度,一般情况下要限制在 255 字节内,每条记录中只能有一个可变长的字段并且不能建立索引,因此无法在该字段中查找特定单词。但是,许多用户可能已经看到 FileMake Pro4.1 和 Microsoft Access97 在维护数据记录方面十分有效。鉴于两者都提供关系数据库工具,我们建议用户开始只使用简单的文件。FileMake Pro 具有跨平台兼容性,也就是同一文件既可在 PC 中使用也可在 Mac PowerPC 中使用。Microsoft Access 不能用在 PowerPC 版本中,而在 WindowsNT 平台上这两种程序都可以使用。

(三) 图像数据库

正如前面所说的,有几种图像数据库程序能够存储、显示和检索图像,它显示文本的能力有限,却提供了有用的“画廊”式缩略显示功能。FileMake Pro 不具备这种功能,但可以先产生缩略图像,再贴到 FileMake 中。所有图像数据库程序,包括 ThumbsPlus、Cumulus、Portfolio 及 Multi-aid Search 都共有一种很有用的功能,就是可以自动扫描硬盘并给每个文件生成缩略图。这些程序也允许将图像存储在可移动介质中,如 Jiz Zip 和 Mag-Optical 盘中。

另外, Canto Cumulus 可将缩略图像插入到一个 FileMake Pro 数据库中; Extensis Portfolio 和 ThumbsPlus 的最新版本也给 PowerPC 平台提供相似的功能。所有这种程序还允许用户以全屏显示缩略图, 并直接打开原始图像文件。这些程序还提供有关文件的大小、存储位置、文件格式、图像维数及关键字等信息。这种程序不能在扩展 Z-轴上产生一个简单的 Z 投影。在一个 Z-系中的缩略图只能是该 Z-系图像堆的第一幅图像, 但由于第一幅图像一般在有用数据的边缘, 所以缩略图像的利用价值不大。如果将一组图像转给一个图像处理程序, 如 NIH-Image, 建议将这组图像在 Z-系上建立 Z 投影, 并作为图像堆的第一幅图像。把这幅图作标记以免与其他主要部分相混, 这样得到的缩略图将包含 Z 投影。

除了显示大量的缩略图像, 图像程序还允许用户同时观看一个文件的缩略图和一个图像信息列表。

四、图像保存以及图像格式

多数共聚焦显微镜具有多用户环境, 一天产生的图像可能占据数千兆或更多的空间, 这将迅速占满一个大硬盘。因而, 多数共聚焦设备提供了向可移动存储介质转存数据的方法或者通过网络送到远端用户实验室的计算机中。将采集的数据转移, 是所有计算机常做的工作, 以便腾出空间给其他用户使用。注意, 当确认已经将你的数据做了有效备份之后, 再删除原始文件。一般定期将原始文件的备份存入 CD-ROM 中以作长期保存, 并且在数据库中应把文件的存储位置记录下来, 如 CD-ROM 盘标记号。

本章描述的所有图像数据库软件将图像集和缩略图保存为普通文件格式 (如 TIFF/TIF、JPEG、PICT) 或者是可以“预览”图像的文件 (如 Illustrator、Photoshop、Canvas 等)。

但是, 各种共聚焦显微镜产生的文件格式有所不同, 这与每种显微镜所带的软件有关。Bio-Rad 用唯一的文件格式, Leica 是简单 TIF 格式, 老版本 Zeiss 也是 TIF 格式, 新版 Zeiss 根据采集数据的方式不同而有别, Zeiss LSM 510 可选择 8 位或 12 位采集方式。他们正在使用以前的格式, 但将转向 TIFF6.0 标准, 即 Multi-TIFF 格式。新的 Olympus Fluo View 按 12 位/通道采集图像, 可以存贮为多种文件格式, 如 12 位 Multi-TIFF、8 位 TIFF 或 24 位 RGB 格式 (8 位/通道)。NORAV 共聚焦用于 SGI 工作站, 文件存贮格式为 8 位。

一种统一的数据文件格式的不足就是容易引起混淆。但有希望看到, 随着共聚焦显微镜工业的成熟, 将最终导致一种更广泛使用的文件格式, 正如现在发生在放射影像 (DICOM) 和卫星成像 (HDF) 领域的情况。

图像文件结构的变化对用户和生产商都会产生特殊问题。无论来自图像处理软件还是图像数据库, 共聚焦显微镜协会只代表了少数用户, 而大多图像数据库的作者是为广大消费市场设计软件的, 并不去迎合像 Bio-Rad、Olympus 等专门的需要。

最近, 几家软件公司都有兴趣以共聚焦显微镜工作者为客户。最突出的当属 ThumbsPlus, 它现在支持 12/16 位通道, 可直接读取 Olympus Muti-TIFF 文件和 Bio-Rad*.PIC 文件。Extensis Portfolio 和 Canto Cumulus 也预言他们的下一个版本可能支持 Bio-Rad 格式。

以下介绍三种重要的采集和存储图像的策略。

(一) 使用目录和子目录来归类文件

给目录命名可以按其存放的实验内容而定, 例如: Calbindin-retina 子目录可能包括: 猴 Calbindin、猪 Calbindin 等, 在猴的目录中, 还可以再建子目录反映每个实验。

(二) 采集图像时, 使用数据库程序

可以用简单廉价的数据库程序, 如 FileMake Pro4.0, 将每幅图像信息输入到数据库记录中, 程序自动给每条记录一个序列号, 记录中包含一个字段可以记下原始数据所存的目录名。一个 Z-系, 可作为一条记录保存 (适用于 Bio-Rad, 当一个 Z-系存于某一个文件中; 如果对 Leica, 一个 Z 系保存为多个文件, 则应采用另外的策略)。分配的序列号现在都用作存储原始图像的文件名。为安全起见, 文件名至少用不少于 5 个字母的序列号。在 Bio-Rad、Leica、Zeiss 及 Olympus 中, 当存储一个很长的 Z-系列

图像,一般会覆盖文件名中第8、第7和第6个字母,因而可以起文件名为“Myfilenw.tif”,而对多标记图像或Z-系列,可换名为“myfile01.tif, myfile02.tif, myfile03.tif, ……, myfilexx.tif”。

(三) 工作完成后, 图像数据库的使用

一旦用户完成一个阶段的采集图像工作,并将图像传送并存储于最后的介质或位置上,就可以用诸如ThumbsPlus等程序立即生成缩略图像,这样也将有助于用户提取图像特征,并给缩略图像加上适当的关键词。

(四) 各种图像数据库软件的比较

有许多图像软件适合与共聚焦显微镜连接,下面的列表只是这些程序的一部分。选择这些软件的主要依据包括:①跨台兼容性,因为许多用户使用PC和Mac计算机;②网络工作能力;③识别多种类型文件的能力,包括Bio-Rad、Olympus、Zeiss和Leica;④现在或潜在的读取12/16位通道图像的能力;⑤从存储于原始文件中读取采集参数的能力。

现在只有ThumbsPlus能够直接读取Olympus FluoView 12位文件和Bio-Rad文件,Extensis和Canto不打算发展这种计划,考虑到Bio-Rad共聚焦使用广泛,并有唯一文件格式,因而对Portfolio 3.0和Cumulus 4.0的使用会大受限制。但是,如果用户定期将Bio-Rad文件转到NIH-Image中,得到的8位TIFF文件就可以用在所有程序中。ThumbsPlus基本上可以显示一个Z-系的所有图像。Cumulus、Portfolio和ThumbsPlus都指出他们将可能实现读取和显示电影PICS格式的功能。

ThumbsPlus具备的最有价值的操作之一是他允许用户剪辑,改变图像的亮度、对比度和色彩平衡而不会改变原数据文件。

由上述讨论可知,目前尚没有一种程序可以完全符合共聚焦显微镜工作者的全部要求。最接近的当属ThumbsPlus,因为只有它可以读取Bio-Rad 8位文件,Olympus 12/16通道Multi-TIFF图像,可以读取共聚焦数据文件的采集参数,并可以工作在Windows 3.11、MacOS、Windows NT和Windows 95等平台上。

ThumbsPlus、Portfolio和Cumulus可以在网络上运行,当然其可靠性和成本各有不同。虽然Cumulus是一个很好的程序,但用户要考虑一下性能价格比。Cumulus 4.0有许多优秀的功能,包括与FileMake Pro有很好的联系,可以高速操作大量图像,以及最复杂的查找引擎。Portfolio 3.0在市场上已有多年,不同时期取名不同:开始是由Muti-Ad经营的search1.0;接着卖给Adobe,更名为Fetch 2.0;现在由Extensis经营,称作Portfolio 3.0。Portfolio的主要变化在于引入了跨平台兼容性,增加文件滤镜,以便读取更多的类型文件以及网络工作能力。这种程序非常好学,产生缩略图像很快。

(五) 一幅图像要存储多少种版本

采集一个样本的图像不会是完美的,这在共聚焦图像的确是事实。有许多可变的因素,如视野(field)的切面、图像方向、噪声、衰减褪色、聚焦深度、对比度、亮度、色彩平衡的变化等。结果会发现,同一个样本可以得到几幅不同的图像,各自表现出略有差别的特征。这种样本会给图像的存贮和检索带来额外的负担。

一旦采集了一幅图像,就必然要对数据集进行各种处理,通常称为图像处理。图像处理包括一系列的操作,从简单的改变图像亮度和对比度、到剪辑图像、产生立体效果、动画效果、排列多层面的图像堆、变换颜色、加强图像的局部细节,最后再将处理后的新图像保存。这种处理,要求非常大的存储空间,表现在使用CLSM过程中的三个地方:①数据采集;②图像处理和分析;③准备最后发表的图像。

必须给这些处理过的文件命名。建立这些文件名应该和原文件名相似,这样可以保持一种继承性,便于修改或对原始数据重新采样。

每个新文件的信息可以记录在主数据库中的一条新记录中,或在该记录中的某一字段中注明对原数据集做了怎样的图像处理操作,结果存在何处。一般将这些信息存在同一条记录中,作为图像集的历史,当准备最后发表时,有助于查找相关的图像。

第六章 图像变形技术和数字电影

随时间的变化进行观察,对于理解生物学事件(如胚胎的发生和发展)是十分必要的。由于共聚焦显微镜技术的发展和最新探针(如绿荧光蛋白)的不断出现,使越来越多的样本可以在存活状态下观察。但要在共聚焦显微镜下观察它们还必须进行切片和固定,再用抗体探针染色,这样就能用多个样本的静态图像来记录实验发展过程中的不同阶段。如果能够采集足够多的这种图像,就可以用动画的方式模拟实验的过程。但是,这样做是不现实的,因为需要大量的动物样本和图像。实际上,我们可以从整个发展时间段和所有静态图像中取得的一些有代表性的图像,然后按一定顺序排列,便可以建立起反映实际过程的视觉再现。

计算机技术提供了另一种方法来模拟随时间变化的过程:一种叫做变形(morph)的技术,一开始主要用于电影和工业广告,以产生特殊视觉效果。变形就是将一幅图像可控地渐变成另一幅图像,给计算机两幅图像,一个是起始图像,一个是终止图像,于是就可以计算出产生变形效果所需要的中间图像,并得到从第一幅图形状变为第二幅图形状的运动轨迹(path)。当从起始图向终止图渐变时,外轮廓就被拉伸变化成另一个轮廓。因为只用了少量的不同时间点的图像,变形只能是真正运动的一种近似。因此,变形技术应该用作一种显示或演示工具,而不能用于数据定量分析。

对共聚焦图像作变形处理就可生成一个数字电影文件,模拟从一个静态图像到另一幅静态图像随时间变化的过程。这个数字电影文件可以直接在计算机上播放,也可以存在录像带或CD-ROM中,还可以在网上浏览或编辑到一个更长的电影序列中用于会议或课堂演示。计算机只需很少的图像就能产生所有的中间帧图,而且处理过程比较快,不用什么昂贵的设备,但必须要掌握和熟悉有关图像处理、图形和动画格式方面的知识。

变形技术所需工具适用于Macintosh、PC和SGI环境以及大多数其他计算机平台。本文中,主要描述在Apple Macintosh机上的变形技术。本文所描述的技术可用于任何平台,只有个别细节与所选的软件有关。其他计算机平台上可用的软件,后面将给予论述。与本章相关的电影剪辑可在以下网页上找到:<http://www.academicis.org/is/multimedia>。

一、材料

(一) 硬件

1. **计算机** 因为变形技术对图形和处理器的要求相当高,最好使用高性能系统。建议用一台Power Macintosh计算机,其处理器能够达到极快的运算,在一个称作“着色”的过程中得到目标运动的轨迹。用于产生变形的系统技术指标应达到:机型Powermac 8500/120,内存128MB以上,硬盘20GB,显存4MB及一台能显示24位彩色分辨率达1 152×870的17英寸显示器。使用一台230MB磁-光(magneto-optical)驱动器暂存备份数据,并将最终的数据写入CD-ROM存档和分类。

2. **内存(RAM)** 对内存的要求依据图像的大小和变形时形状的复杂性而定,推荐使用128MB以上内存,也可用虚拟内存来补偿内存的不足,但会明显降低计算机的运行速度。

3. **硬盘** 数字电影文件的大小取决于它的进一步用途。例如,要是录到录像带上,文件就很大,而用于WWW浏览就可以小一些。要求硬盘足以存贮电影的几个版本的备份。

4. **显示器** 推荐采用高分辨率大屏幕显示器, 必须精确显示 (绘制) 图形, 并能够放大局部图像来观察细节部分。显示卡上至少要有 8MB 显存以满足分辨率和 24-bit 图像显示。

5. **数据存档** 数据文件必须安全备份, 并且最后要移去以便给下一个项目腾出空间。有多种存档方式可选: 目前, 可擦写 CO-ROM 的价格已可以承受, 且 CD-ROM 驱动器也成为大多数计算机的标准配置; 可以磁-光转换的磁介质, 如 Sy-Quest 和 Iomega 驱动器也可选, 其成本较低, 数据存储可靠, 不过一般 CD-ROM 常用于图像存档。

上述对硬件要求已经足以产生用于网上播放的变形电影文件。但要想在计算机上播放或记录在视频设备上, 还需额外的硬件。多数 Mac 计算机配有多视频输出端口, 有些还有额外的 VGA 显示器端口, 另外一些 RCA 或 S-Video 端口。只要有合适的适配器, 这些视频输出端口就可以接到标准的视频监视器上或视频投影仪上。

6. **数字视频硬件** 要将数字电影记录到录像带上, 必须有一个数字视频卡。在 AV Mac 计算机上就配有一个视频卡, 能产生质量相当好的视频, 但要达到专业水准, 就要求具备三端口视频卡, 如 TARGA 或 Radius 卡。将数字电影文件转到录像带上, 要有较高分辨率 (至少 640×480 像素) 及帧频 (约 30 帧/秒)。计算机必须在很短时间内传送大量的数字视频数据, 但由于数字电影文件太大而不能一次调入内存, 就得分批 (spool) 放在硬盘上。标准的 Mac SCSI 总线达不到高速传送数据并产生专业级视频的要求, 因此要配上一个 SCSI 加速卡和一个 AV 硬盘或硬盘阵列。当然, 如果不作专业级要求, 一个标准 Mac 计算机就够用了。

(二) 软件

产生一个电影文件要经过好几个步骤, 变形处理只是其中一步。第一步要进行图像处理, 将从显微镜下采集到的原始图像作缩放、格式化、清理背景处理, 以备变形处理之用。要实现图像编辑功能, 诸如尺寸缩放、旋转、清理背景、调节亮度、对比度、色彩平衡等。软件 Adobe Photoshop 是一个工业标准, 但是 Photoshop 4.0 版没有批处理功能——自动做多项图像处理工作。有些软件具备专用批处理功能: Debabelizer 商业软件可兼容于 Macintosh 和 Windows 环境, 拥有大量的图像处理函数和转换函数, 功能强大; Graphic Converter 虽不如 Debabelizer 功能多, 但可以成批转换图像格式, 并也有许多基本函数, 如尺寸缩放、彩色表变换、锐化处理等用于批处理工作。

每一种主要的计算机平台都有一些变形处理软件。本章只介绍 Avid 公司的 Elastic Radity, 它能够产生很高质量的变形效果, 并适用于大多数计算机平台。由变形软件产生的文件为数字电影文件格式。最通用的格式为 QuickTime, 该数字视频格式适用多个平台, 如 Mac、Windows 和 Unix, 并且也被 ISO 标准认证。这种格式的电影文件可以播放, 插入文字图形, 也可合并到另一文件中产生更大的电影文件。为了播放电影文件, 必须有相应的播放器, 如 QuickTime Movie Player 程序, 另一程序 Peters Player 处理很大的电影文件时比前者稍好一点。为了合并多个文件并加入标题、音效, 还需要视频编辑软件, Adobe Premiere 是工业标准; Avid 公司的 Videoshop 功能稍弱, 但较便宜, 且提供了所有编辑数字电影所必要的基本功能。

1. 软件公司

Adobe Photoshop, Adobe Systems, San Jose, CA

Adobe Premier, Adobe Systems, San Jose, CA

Debabelizer, Equilibrium Software, Sausalito, CA

Diretor, Macromedia, Inc, San Francisco, CA

Norton Utilities, Symantec Corporation, Cupertino, CA

2. 其他可选视频编辑软件

Macintosh: Media Cleaner Pro, Terran Interactive, Inc, San Jose, CA; Videoshop, Strata, Inc, St George, UT;

Windows: MGI VideoWave, MGI Software Corp, Richmond Hill, Ontario L4B 1H8, Canada.

3. 其他可选变形处理软件

Macintosh: 可参考以下网址: <http://www.gryphonsw.com/>, <http://www.metatools.com/goo/goo.html>, <http://www.valisgroup.com/>。

Windows: 可参考以下网址: <http://www.gryphonsw.com/>, <http://www.metatools.com/goo/goo.html>, <http://www.valisgroup.com/>, http://www.intermarket.net/blackbelt/sw_wi_dl.com, <http://www.algobit.com/morph/morph.html>。

二、方法

(一) 根据可用硬件资源及最终目的规划变形工程

在修改原始图像之前, 规划变形工程是很重要的, 并且要求决定帧大小 (动画中每个图像大小单位为像素, 也称分辨率) 和帧频 (屏幕闪烁的速率, 单位为帧/秒)。图像和动画的分辨率和帧频可按比例降低, 但无法按比例增加。降低的结果是图像数据和运动数据丢失, 且不可恢复。最好是生成电影时用较大的帧尺寸和帧频率, 然后再按比例降低。如果最开始就很清楚变形工程的要求是什么, 就能节省大量时间。图像分辨率和帧频的具体数值取决于工程所用的变形技术及硬件资源。

(二) Photoshop 中的图像预处理

更多关于图像处理的信息参见下面的网络主页:

MIT15.556 数字资源图像主页: <http://web.mit.edu/beblack/www/digim.htm>;

Kalak 数字学习中心: <http://www.kedak.com/daiHome/DLC/>;

弗杰尼亚大学图书馆数字图像中心: <http://www.lib.virginia.edu/dic/info/webinfo.html>。

1. 图像旋转 对图像作变形处理时, 为使变形表现得更逼真, 往往先要作旋转处理, 根据两图像的相互关系调整图像方向。有好几种旋转图像的方法, 正反旋转 90° 的处理过程实际上就是将图像中每个像素再重新映射到另一个位置, 不造成数据丢失。但如果要精细旋转某个角度, 就要重新计算每个像素, 这会引起部分数据丢失。Photoshop 软件中有计算旋转的非常好的算法, 但是为保证图像质量, 旋转角度应有一个限制, 最好是以 1° 为最小单位。在 Photoshop3.0 以上版本, 作图像旋转非常方便并可使用多图层。先复制一幅图像, 再到另一个图像建立一个新图层, 将复制的图像贴到该层中, 适当调节透明度, 使两幅图像都能被看见。这时, 就可以分别旋转两幅图进行比较, 当两者匹配后, 再将新层中的图像复制粘贴到新窗口中, 并保存为一幅新图像。

2. 图像尺寸缩放 图像旋转之后可能还要进一步改变大小。从主观上看, 如果相关的两幅图像大小不太匹配, 变形时会缺少真实感。从技术角度讲, 两幅图像应具备相同的分辨率才可被变形软件处理。如果不是, 就要用程序改变图像尺寸使其分辨率一致。为了使尺寸缩放处理可控, 建议最好在使用变形软件之前先做此处理, 这里确定下来的图像大小, 决定了最终电影的分辨率,

有两种方法来改变图像大小, 一种是改变图像周边而保留图像中间不变, 另一种是按比例缩放。前一种方法可以通过裁剪图像四周来减小图像或者通过给图像四周加像素来变大图像, 这种处理不影响图像中间部分的数据。具体操作是选中一块将它“裁去”; 或者, 为了使图像变大, 可将整个图像选中、复制、粘贴到另一幅满足分辨率和背景色要求的图像上。第二种方法先要重新计算所有像素点, 再生成另一分辨率的新图像, 这一处理使整个图像数据发生改变。具体实现是选中“图像”菜单中的“图像大小”一项, 就可以根据需要指定新图像的分辨率。

上面之所以分别解释这两种不同的尺寸缩放方法, 是为了提醒使用者要小心选择使用。大多数情况下, 第一种方法造成的图像损失最小, 可能的话应使用这种方法; 第二种方法要有节制地使用, 因为每缩放一次, 图像数据都要有所丢失, 最终可能无法使用。一般最好只缩放一次, 如果对缩放结果不满意应取消该操作再重作一遍, 以免多次缩放。在按比例缩放时, 最好保持图像原有的纵横比不变, 使图像

不致失真。

3.清理图像背景 下一步处理称作“清理背景”。这一步要使图像背景一致，去掉那些不需要的部分，而加入一些需要的东西。这样做有两个原因：第一，因为变形是用来演示而非数据分析的工具，应该去掉那些与变形无关的任何东西，否则这些部分在变形时也发生移动和拉伸动作，会分散变形时的视觉注意力。第二，如果图像背景颜色一致，可使电影文件的压缩比率大大提高。有许多方法来清理背景，其中一个简单而有效的方法是用画刷涂掉图像中无用的部分。

一旦完成了图像的旋转、缩放和清理背景的工作，就可以做最后的修补工作。根据需要，可以适当调整图像的亮度、对比度、清晰度和颜色等。

(三) 建立变形工程

Avid 的 Elastic Reality 在大多数硬件平台上都可以运行，并且效果很好。但不管使用什么软件，原理都是一样的。这里给出一个例子，在一段有关进化现象的电影中，使用了变形技术，从中展现了创建变形的概念。

1.图像预处理 首先，在 photoshop 内，改变图像大小，使图像的结构、长度相同，清理并修剪图像 B，让每一幅图像有同样大小的背景。然后将图像拷贝并粘贴到 640×480 的黑色背景中，从而创建了具有特定分辨率且保持原有图像纵横比的图像。如果简单的将其设为 640×480 大小，图像会扭曲失真。用 Photoshop 将图像 A 的颜色由蓝色改为褐色，这样，转化过程会显得更加平滑自然。

2.将图像导入 Elastic Reality 接下来把图像引入 Elastic Reality，并定义外轮廓（图 6-1，图 6-2）。Elastic Reality 用 Bezier 曲线绘制外轮廓，因而可以提高轮廓中相应线段分辨率的精度。为了精确地确定轮廓并避免重叠（Elastic Reality 不允许重叠），图像必须多次放大，且相应线段分辨率必须非常高。当图 A 中的轮廓变为图 B 中的轮廓时，图像中的一切都要被转移过去。就好像整个图像由橡皮制成，可任意地拉伸、挤压。这样的效果使得转化过程显得自然。在变形着色之前，将所有的轮廓都完美地建立起来是不太可能的。在 powermac 上，着色变形只需几分钟，可进行变形着色、观察，并添加、调整相应的轮廓线，直到理想效果。

3.着色变形 确定了所有的轮廓，并且调整了相应轮廓线后，就可以创建动画文件了，将这个过程称为着色，这包括计算从图 A 到图 B 的运动过程，并产生所有相应的图像以创建动画。其中一些参数，如帧频、总帧数、图像大小以及压缩格式必须进行规定。着色只需几分钟时间，之后就可以回放动画文件（图 6-1D 及图 6-2D 展示了着色变形的一些剪辑）。

4.动画文件的后处理 后处理和预处理一样重要，并且耗费时间。不进行后处理，变形电影也可播放。但是为了使动画更专业、美观或可用于特定用途，动画必须进行后处理。后处理有许多步骤，如添加题目、将动画加入到更大的动画中、降低分辨率进一步压缩或将其录制在录像带、CD-ROM、WEB 上。下面介绍一种简单的处理方法：将变形着色并保存为一组标号的 PICT 文件（或其他格式，但 PICT 在 Macintosh 上运作得最好）加入标题，那么标题将占用前几个画面，所以 PICT 文件顺序不应从 1 开始。标题画面的拷贝份数由每秒帧数与标题的显示时间的乘积来确定。例如，每秒帧数为 10 帧且标题显示时间为 3s，那么标题画面将被复制 30 份。给这些图像文件命名，应和它们在变形序列中相应的序号一致，如“Morph0001.PICT”，接下来，在 Photoshop 等软件中制作标题画面，并确保与动画有相同的分辨率和色度。根据序号，给这些文件起与动画文件相同的名字，根据需要制作相应数量的拷贝，最后，用软件将所有标号的图像组合在一起，形成动画，并保证有正确的帧频、压缩格式等。在 Macintosh 中，播放软件有“Quick Time Converter”（免费软件）和“Movie Conversion”（共享软件）。

介绍在动画中加入标题或字幕的预处理技术有两个原因：一是编辑数字动画文件的基本过程简单，二是不用昂贵的软件就可完成。但有些专用软件可以使数字动画编辑更快、更简单，Adobe Premiere 和 Adobe After Effects 就是很好的例子，这两个软件都可以用在 Macintosh 上，也可在 Windows 平台上应用，并且已成为数字动画合成的工业标准，当然还有其他一些软件。

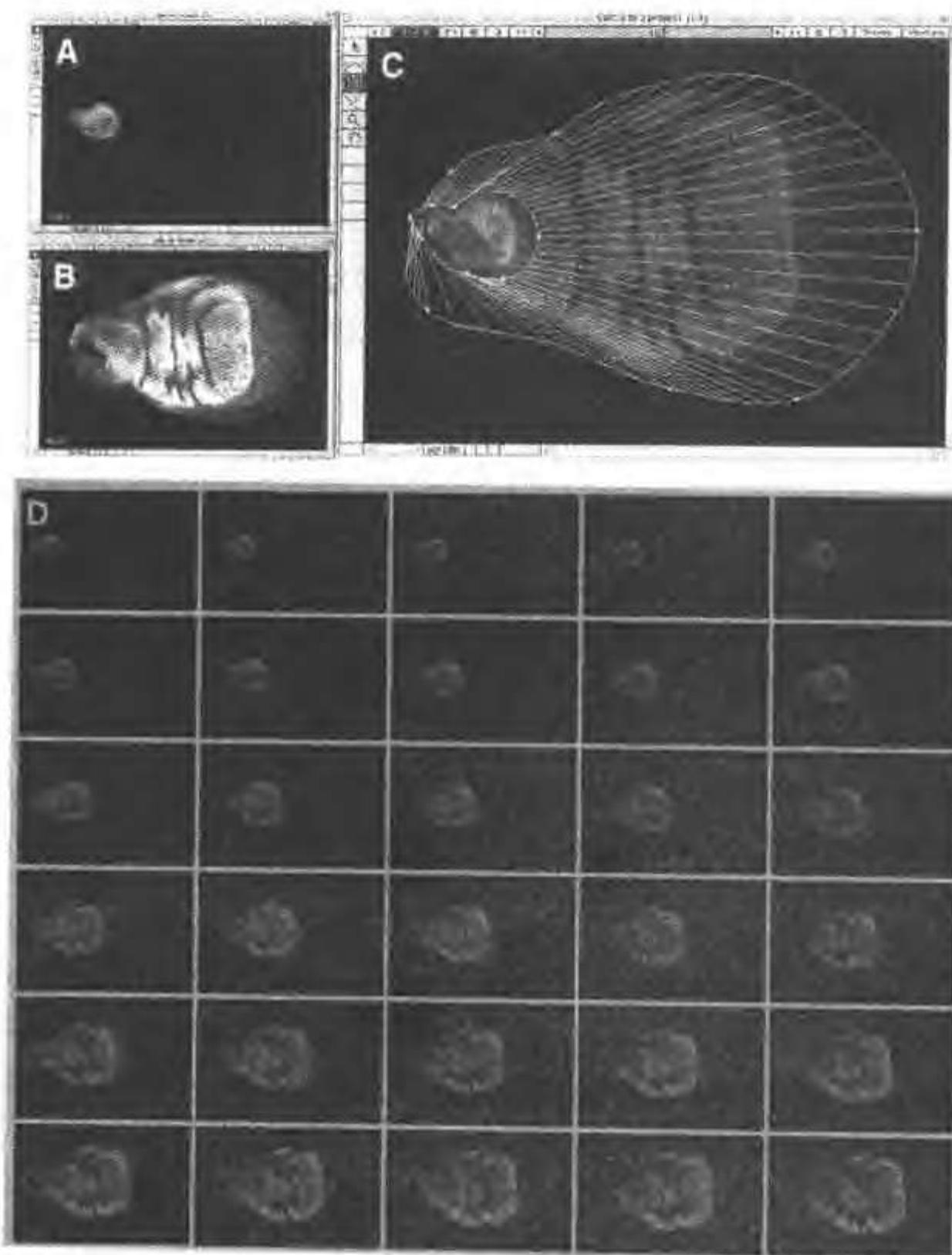


图 6-1 两种共聚焦图像的变形 果蝇二龄期翼成虫板 (A) 变形到三龄期翼成虫板 (B), 从 A 到 B 的运动轨迹显示如 C, 产生的变形系列图像见 D。这一系列图像显示了翼板的生长和无翅基因 (apterous gene) 的表达

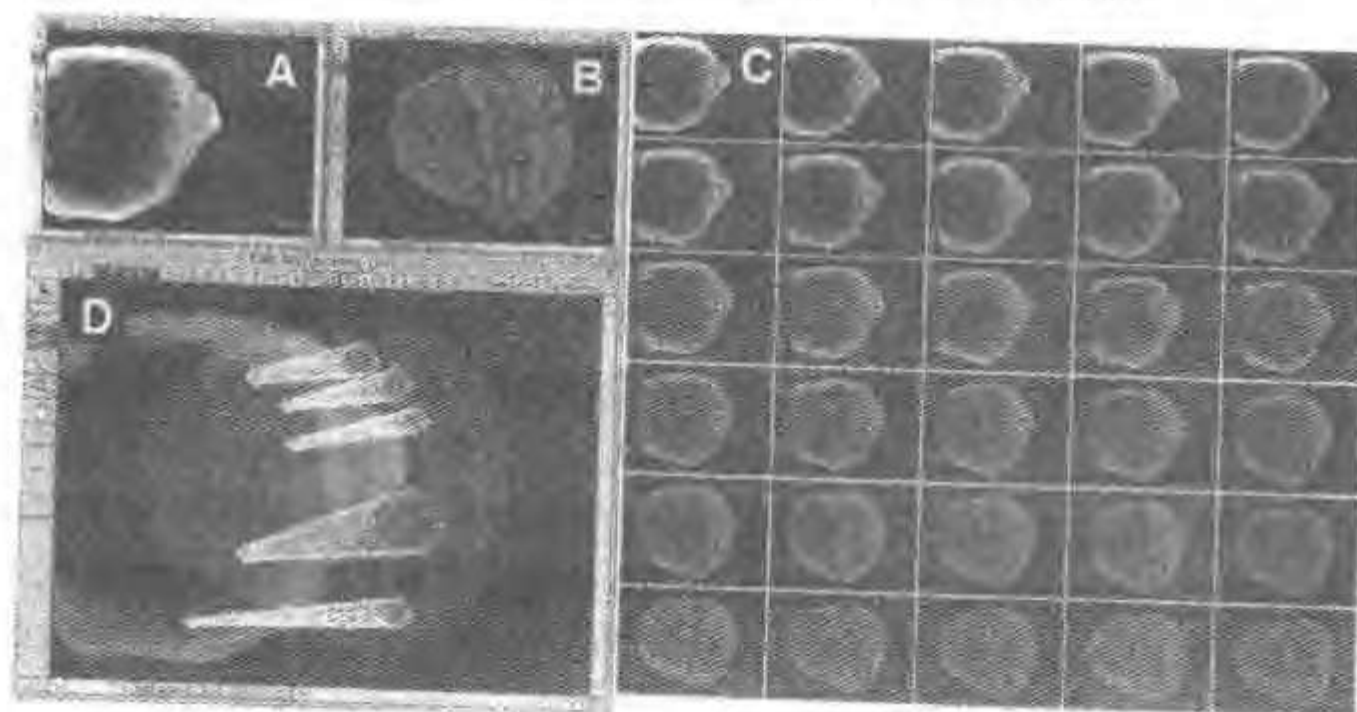


图 6-2 共聚焦图像和来自平板扫描仪 (flat-bed scanner) 图像的变形 蝴蝶五龄后翼成虫板 (A) 变形为蝴蝶 *Bicyclus* sp. 成虫后翅 (B), 运动轨迹显示如图 C, 产生的变形系列图像见 D。图像显示了翅的发育过程以及发育与 *distal-less* 表达的关系, 并可看到成熟翅上眼点 (eyespot) 的位置

5. 创建动画文件 当完成了动画制作, 所有的标题画面、字幕等都加入到动画中后, 最终的动画软件就算完成了。对动画中的帧数、压缩格式、色度和帧大小等参数的设置在前面已经讨论过, 当规划一个动画工程时要使用的硬件资源和产品目标, 这些参数可以保留, 也可以因其他用途而修改, 例如, 要将动画文件录在录像带上, 动画应为 640×480 分辨率且帧频为 30 帧/秒。

三、注意事项

1. 就数字视频而论, 硬盘越大越好。就是说, 数据传输速度应在硬件允许情况下尽可能高, 传输速度越高, 视频质量也越高。一个电影文件的大小由 5 个因素决定: 图像分辨率、帧频、彩色色调、电影长度(或总帧数)和压缩比。NTSC 视频制式的典型分辨率为 640×480, NTSC601 为 720×486, PAL 制为 512×768。NTSC 制式的典型帧频为 30fps, PAL 制为 25fps。计算一段视频的大小, 要将一帧的像素乘以每像素的 bit 数, 再乘以帧频, 再乘以这段视频持续时间(秒)。例如, 一段 NTSC 制视频为 640×480 像素分辨率、24-bit 彩色和 30fps 帧频, 就要占用每秒 27MB 的硬盘空间。播放这样的视频, 如果有几分钟, 不仅要占用数千兆硬盘空间, 而且要求计算机必须具备以 27MB/秒的速度将数据从硬盘传输到视频卡的能力。因此, 必须进行简化处理, 压缩技术是最有用的简化手段。

但是, 减小文件大小的代价是牺牲图像质量。有些压缩格式在压缩和解压缩时要求计算机有更强的处理能力。JPEG 是一种常用编码, 可以很好地综合图像质量和压缩比, 但要压缩和解压这种格式的文件, 需要计算机特别大的处理能力。一般情况下, 采用一个专用视频卡进行解压缩处理, 以缓解计算机 CPU 的压力。高性能的视频卡有一种专用压缩格式, 很好的进行解压和播放视频。QuickTime3.0 版提供较好的压缩算法, 在较高压缩比的情况下达到更高的视频质量, 并且不需要昂贵、高级视频卡就能达到很好的视频播放质量。上面提到的 5 种因素中, 任何一种都可调节, 来改变电影文件的大小。建议大家多试几种不同的设置, 看看哪一种能使视频文件播放得更好、更自然。

数据传输速度问题可能会决定一种给定的系统是否足以实现某种需要的视频应用, 但本文不准备讨论这些。系统中数据传输速度依赖许多因素, 其中两个最重要的因素是 I/O 总线(一般在 Mac 上为 SCSI 总线, PC 上为 IDE 总线)和视频卡。

2. 一般情况下, 录制录像带或直接在计算机上播放电影所存在的问题差不多, 二者共同目的是尽可能得到好的观看效果, 其区别是前者输出到一个视频录制设备, 后者将信号输出到一个视频显示源上, 如大屏幕显示器或投影仪。

3. 要将电影文件存到 CD-ROM, 最值得关注的是数据传输速度。一般地, CD-ROM 的传输速度比硬盘慢, 一个 2 倍速 CD-ROM 驱动器, 传输速度最大到 300kps, 一个 4 倍速 CD-ROM 传输速度为 600 kps, 一个 6 倍速 CD-ROM 为 900 kps, 以此类推。相比之下, 多数 SCSI 硬盘的传速至少在 1 000 kps 或 1MB/秒。要在 CD-ROM 上直接播放的电影, 通常帧尺寸较小(240×180 或 320×240), 帧频较慢(10 或 12 kps), 并且以某种压缩格式, 结果传输速度就特别小。为此一个优秀压缩器是 QuickTime 的 Cinepak 压缩程序, 采用了 JPEG 压缩方式, 有很高压缩率, 虽然也可工作, 但播放时可能出现不平滑连续。另一种降低传输速度的办法是把图像转换为 8 位彩色或灰度图像, 得到的文件大约是 24-bit 彩色格式文件的三分之一。

4. 将电影用于网上与 CD-ROM 存在相似的问题。网络和 CD-ROM 的主要不同处在于: 对于 CD-ROM, 数据传输速度比文件大小更重要, 而对于 WEB 主要关心整个文件的大小。我们无法确定在网上的文件最大应该是多少, 这主要依赖于多种因素, 比如浏览器连接速度和对下载电影的兴趣程度。在网上的电影文件一般从 200 千字节到几兆字节。最佳做法是产生一个较大的电影文件(质量也较好), 再缩小到需要的文件大小, 最后重新编译成为图像尺寸较小、高压缩比的电影。QuickTime3.0 提供流式视频功能, 并且其压缩算法在较高视频质量的同时有较高压缩率, 这对于在网上播放动画特别有用。

5. 如果使用第三方或非属 Apple 的视频卡, 建议使用者仔细阅读附带的使用指南。其中包括详细指

导如何配置系统, 适合与什么硬件配合, 不适合与什么硬件配合, 以及如何将此视频卡连接到计算机、硬盘阵列和所有外部视频设备上。通常各种视频卡还带有专用播放电影文件的程序, 这些专用程序只适合于相应的视频卡, 而不能在其他卡上正常工作。如果要转录到录像带上, 最好使用这种专用的优化过的电影播放器。各种程序总有点不同, 必须阅读附带的说明书, 准确弄清如何使用播放软件。

AV Macintosh 计算机, 没有附带任何介绍如何获得最佳视频质量说明。通常计算机使用手册都应该解释如何将计算机与 VCR 连接, 有好几类视频连接电缆, 所有 AV Mac 计算机都有视频端子, 有的还有 S 端子。因为灰度信息和彩色信号被分离到不同的线上, S 端子可以产生更好质量的信号。如果计算机和 VCR 都有 S 端子, 最好使用它, 把计算机的输出连接到 VCR 的输入。以下几种技巧可以使系统最大限度地提高质量, 对硬盘进行去碎片处理, 可以提高搜索文件的速度, Norton SpeedDisk 软件就可以做去碎片处理。另一种提高性能的技巧是将系统活动进程减到最小, 因为所有的其他进程都会占用内存和处理器资源, 把不需要的进程取消, 保证电影播放器程序之外没有其他应用程序运行。关断网络连接, 可以给电影播放程序尽可能多的内存, 这样播放电影时, 电影数据放在缓冲内存中, 回放时就更平滑连续。设置显示器分辨率为 640×480 (对 NTSC 制式) 或 512×768 (对 PAL 制式)。如果使用 Apple 的 MoviePlayer 软件, 选择“现场播放电影”方式, 可以隐去 Macintosh 桌面, 并可以在电影开始与结束处设置一个延迟。另一种电影播放器, 叫作 Peters Player 也提供现场选择, 还具有较好的内存缓冲算法, 使播放大电影文件时略微平滑一些。最后就可以把磁带放进 VCR 中, 播放电影文件并按“录制”钮。

6. 两种基本的图像格式: 无损和有损。无损格式保留所有图像数据, 因而可以反复多次打开、更新、保存而没有图像衰减, 例如, TIFF、GIF、无压缩 PICT 和 Photoshop 的专利格式。TIFF 格式提供一种称作 LZW 的压缩形式, 但属于无损压缩格式; GIF 也是无损压缩格式, 但只限于 8-bit 图像, 24-bit 彩色图像通常不能转换为 GIF 格式, 否则会丢失大量数据。有损格式为减少文件大小而损失图像数据, 例如 JPEG 和 PICT 格式, 这两种格式保存图像的文件更小一些, 但每次修改和再存贮图像就会丢失更多的图像数据。最终, 会产生太多的压缩损失而使图像无法使用。最好的办法是把这些可能有多用途的图像以无损格式保留一个主备份, 并且应该有限次数地使用有损格式保存图像, 最好只用一次。

7. 在计算机上, 播放电影与录制录像带类似, 所不同之处, 一个是计算机与 VCR 连接, 另一个是在显示器上播放。除了标准的显示器, 还可连接大屏幕显示器、电视或视频投影仪。同样存在的问题包括去碎片处理、减少进程, 扩充和使用内存缓冲处理。

8. 把一个数字电影文件存入 CD-ROM 实际是用 CD-ROM 写入器将它写入 CD-ROM 中。从 CD-ROM 中回放一个电影所存在的问题已在前面一提到, 要基于可用硬件资源和最终目的来规划一个变形项目。电影可以在一个变形处理程序中以需要的分辨率和帧频演出, 也可以先以一个高分辨率和帧频显示再导入到一个视频编辑程序中, 如 Premiere, 重新编辑成低分辨率和帧频。有一些专用 CD-ROM 编辑软件包能够帮助产生很有趣的交互式的多媒体软件, 包括图像、声音、电影和一个新颖的用户界面。这类软件包有 Macromedia 公司的 Director 和 Terram Interactive 公司的 Media Cleaner Pro。

9. 能够与 Web 服务器交换数据是很必要的, 有关细节这里不做讨论。把电影放到 Web 上的最重要的问题是文件大小和格式。如前所述, 文件越小越好。文件格式的问题比较复杂, Web 是与平台无关的, 在 Web 上浏览的人们所用的计算机类型、操作系统版本及所用软件各式各样, 必须考虑到兼容性和标准问题。如果电影以 SGI 专用电影格式放在 Web 上, 只有使用 SGI 的人才可看此类电影。最通用的 Web 电影格式包括 QuickTime 格式、MPEG 和 AVI 格式。对于苹果计算机的用户, 使用新版 Netscape Navigator 或 Microsoft Internet Explorer 及 SGI 新版操作系统的用户使都能看到 QuickTime 格式的电影。MPEG 是与平台无关的格式, 使用 MPEG 播放器程序就可看到 MPEG 格式的电影。AVI 格式特别适用于 Windows 环境, 是 Windows 用户的最佳选择。有一些应用程序能够转换不同的电影格式, 软件 Sparkle 是一个 MPEG 播放器, 可以将 QuickTime 电影文件转换成 MPEG 格式。Vfw Utilities 也是一组应用程序, 可以互相转换 QuickTime 和 AVI 格式。有关在 Web 上生成动画的更详细的描述, 可以参考相关资料。

第七章 细胞体积的原位动态测量

细胞体积调节是适应渗透压变化的基本自我平衡机制，研究细胞体积调节的一种方法是将细胞从组织中分离出来在培养条件下进行处理，但常需要测量细胞处于完整组织的正常生理环境中的数据，此时细胞受到包括细胞间作用、机械作用、离子作用以及细胞外基质（ECM）作用等对其的影响。本章描述用保持组织完整性及细胞在 ECM 中空间结构的器官培养系统来原位测量细胞体积的方法，全面介绍用激光扫描共聚焦显微镜（LSCM）研究细胞体积调节行为。采用关节和胎儿生长盘软骨组织，此方案也可应用于其他动物、植物、真菌的完整组织。如以下所述，选择实验参数必须考虑许多因素，没有适用于所有情况、所用组织的万能设置。

细胞体积的原位动态测量包括提取和查看细胞体积资料的一系列关键方法以及相关优化或校正步骤（图 7-1），描述优化信噪比和细胞活力的显微镜使用方案（图 7-2）（样品和光之间的物理性相互作用可严重影响共聚焦光学探头的精确性），还将介绍评定组织的衰减和轴向扭曲的实用工具，然后给出两种测量细胞体积的方法，最后描述显示细胞体积动态变化的 4D 图像方法。

一、材料

1. 生物性材料 八月龄猪掌关节（处死后 4~5 小时内取材）

2. 培养基/缓冲液

(1) 标准培养液 HEPES 缓冲的 DMEM 培养液（280 mmol/L，pH7.4）；

(2) 低渗培养液 标准培养液 1:2 稀释（140 mmol/L，pH7.4）；

(3) 高渗培养液 标准培养液加 50 mmol/L NaCl（380 mmol/L，pH7.4）。

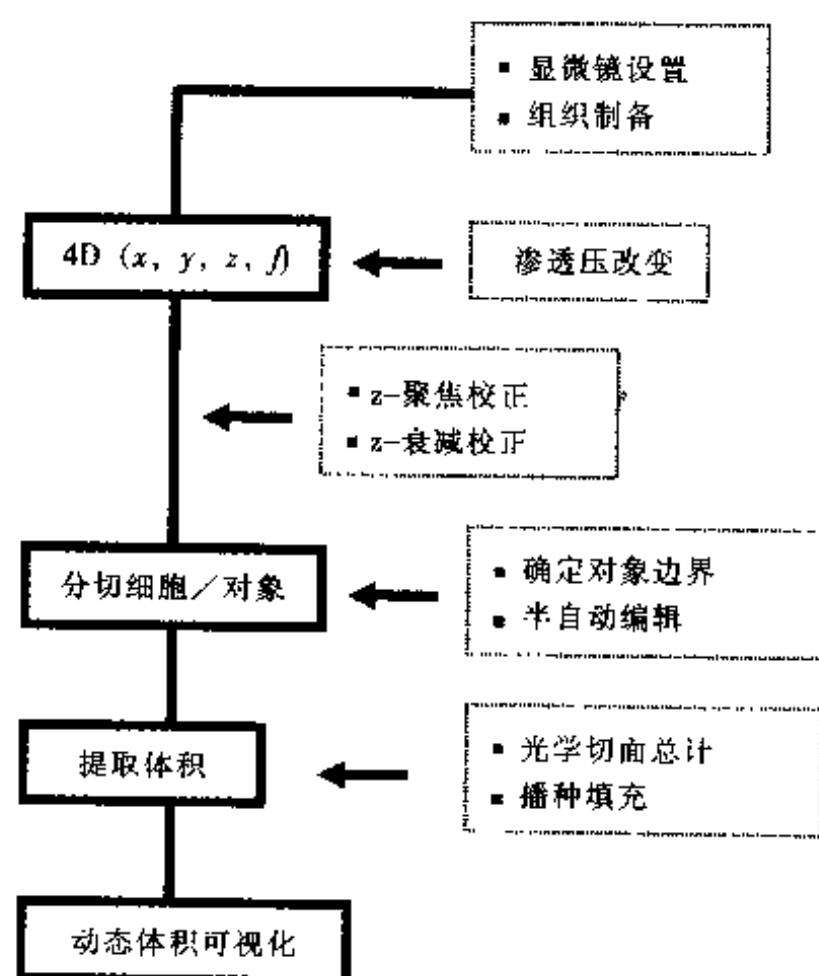


图 7-1 LSCM 动态体积测量的步骤简图

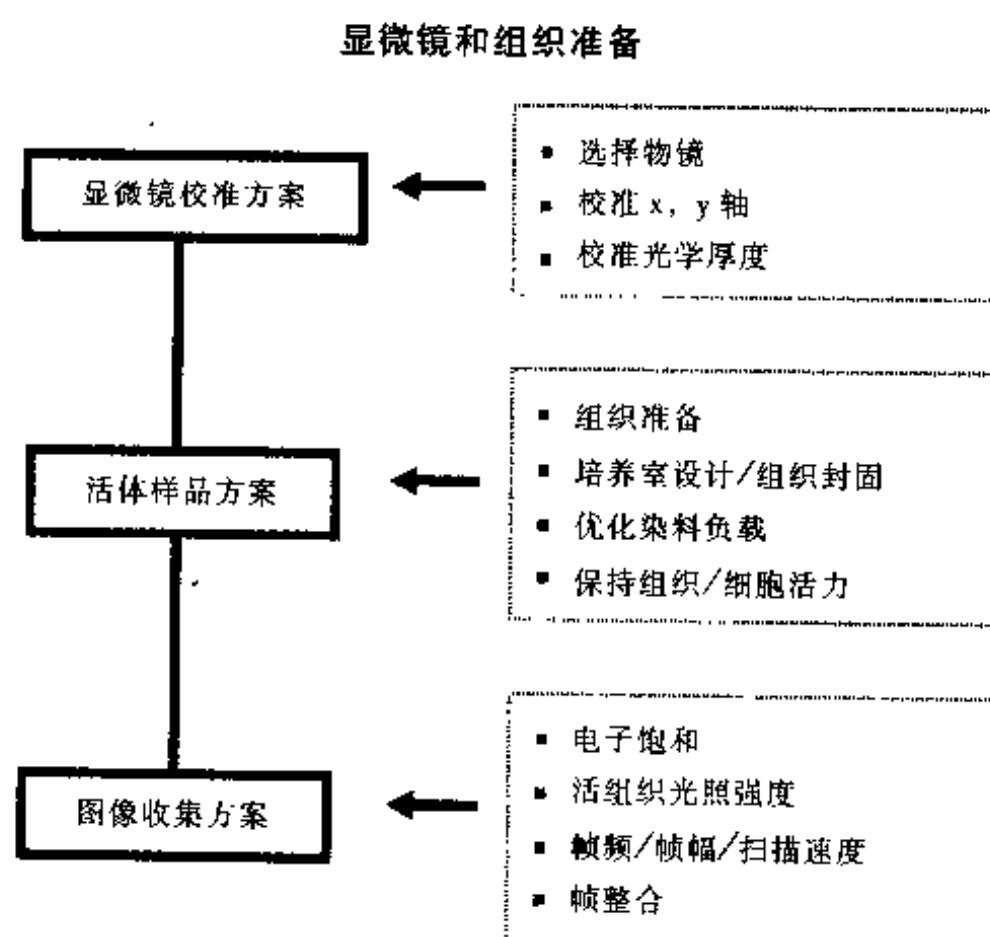


图 7-2 显微镜设置和组织样品制备步骤

3. 荧光染料

- (1) 活体染料 5-氯甲基荧光素双乙酸盐 (CMFDA), 2.25 mmol/L 原料 (Molecular Probes);
- (2) 校准染料 50 μ mol/L 水溶性荧光黄 (Sigma Chemicals)。

4. 生物学和校准用显微镜样品准备

- (1) 组织-盖玻片粘合用①“超级胶”, ②多聚-L-赖氨酸, ③低百分比琼脂糖, ④医用胶如 TissueTAK™, ⑤物理方法如戴网套等;
- (2) 塑料电胶带制作试验室;
- (3) 载玻片;
- (4) 盖玻片 (no. 1.5 厚度) (BDH);
- (5) 组织固定 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液 (PBS);
- (6) 荧光黄标记的乳胶珠 (约为细胞大小), 如: $7\pm 0.3\mu\text{m}$ (Polysciences Ltd)。

二、方法

(一) 共聚焦显微镜成像条件校准 (图 7-2)

1. 物镜选择 当测量位于组织深部的细胞体积时, 主要的限制是物镜的工作距离, 不能从样品切面收集数据, 因为此处细胞被破坏了或正处于损伤恢复反应阶段。最好的共聚焦切面需要最大可能的数值孔径 (NA) (亦即水性样品要高达 1.33), 但对可接受的工作距离, 可能需要较低的 NA 值, 大约为 0.8~1.0, 尽管高 NA 物镜在近样品表面处可以提供最适宜的切面, 但当在更深部成像时图像变得不够锐利并有衰减, 尤其当使用油浸液和 (或) 小共聚焦光圈时, 进一步降低了工作距离, 这种现象更容易发生。浸液物镜的选择并不简单, 要使镜片所要求的浸液介质与所要穿透聚焦样品块的屈光指数相配是非常重要的。大部分组织是水溶性的, 但软骨 ECM 的组分 (如胶原、纤维粘连蛋白和糖蛋白等) 可以分散和折射光线, 因而所有的物镜都要为测量作校准。本实验用 25 \times , NA 0.8 的 Plan Neofluar 物镜, 通过不同的校正可以适用油、甘油、水等浸液。

2. 不同物镜的像素大小: X,Y 轴成像的校准 由于物镜所标记的放大倍数可能不完全准确, 并且显微镜系统可能添加了光学组件, 所以必须检查 (X,Y) 像素尺寸校准。

- (1) 在透射或反射模式下对显微镜计数线成像;
- (2) 测量进入视图区域内分格的长度 (以像素计), 像素尺寸 (以 mm 计), 像素大小为计数线格总长度 (mm) 除以像素数目;

(3) 在以后实验中将用到的成像尺寸、放大倍数、扫描速度范围等都要检查此计算值。

3. 共聚焦针孔设置: 光学切面厚度校准 光学切面厚度依赖于最后视图中的焦点外荧光 (其决定于共聚焦光圈的大小), 以及被照明和检测到的点的大小 (取决于 NA、波长、样品性质等), 在高 NA、可变共聚焦光圈和生物性样品的实际情况中, 要准确计算是很困难的。比较好的折中办法是在实验条件下测量一个测试样品, 穿过平面对象 (薄于轴向分辨率) 的轴向强度剖面可产生平面反应函数 (PRF), 由此可得出切面厚度, 见注意事项 1。

4. 轴向反应测验样品: 反射对比 PRF 可通过测量穿过一平面反射镜 (边界无限薄) 的共聚焦反射光学切面得到, 此反射镜类似 SEM 样品, 用铝、金或银放置在盖玻片表面制成 (图 7-3)。

- (1) 在洁净盖玻片的表面喷涂反射材料;
- (2) 用超级胶封固在显微镜载玻片上, 反射镜表面朝向载玻片 (图 7-3A), 见注意事项 2。

5. 轴向反应测验样品: 荧光检测 很难制作一个真正高分辨的平面荧光测验样品, 但从荧光介质遇到光学边界的边缘反应得出 PRF 则简单的多 (图 7-4A)。

- (1) 生物性样品用的染料 (如荧光黄) 溶于培养基中 (50~100 μ mol/L);
- (2) 将一个箔片或电影胶带制的隔片 (200 $\mu\text{m}\times 25\text{mm}\times 25\text{mm}$) 贴在载玻片上;

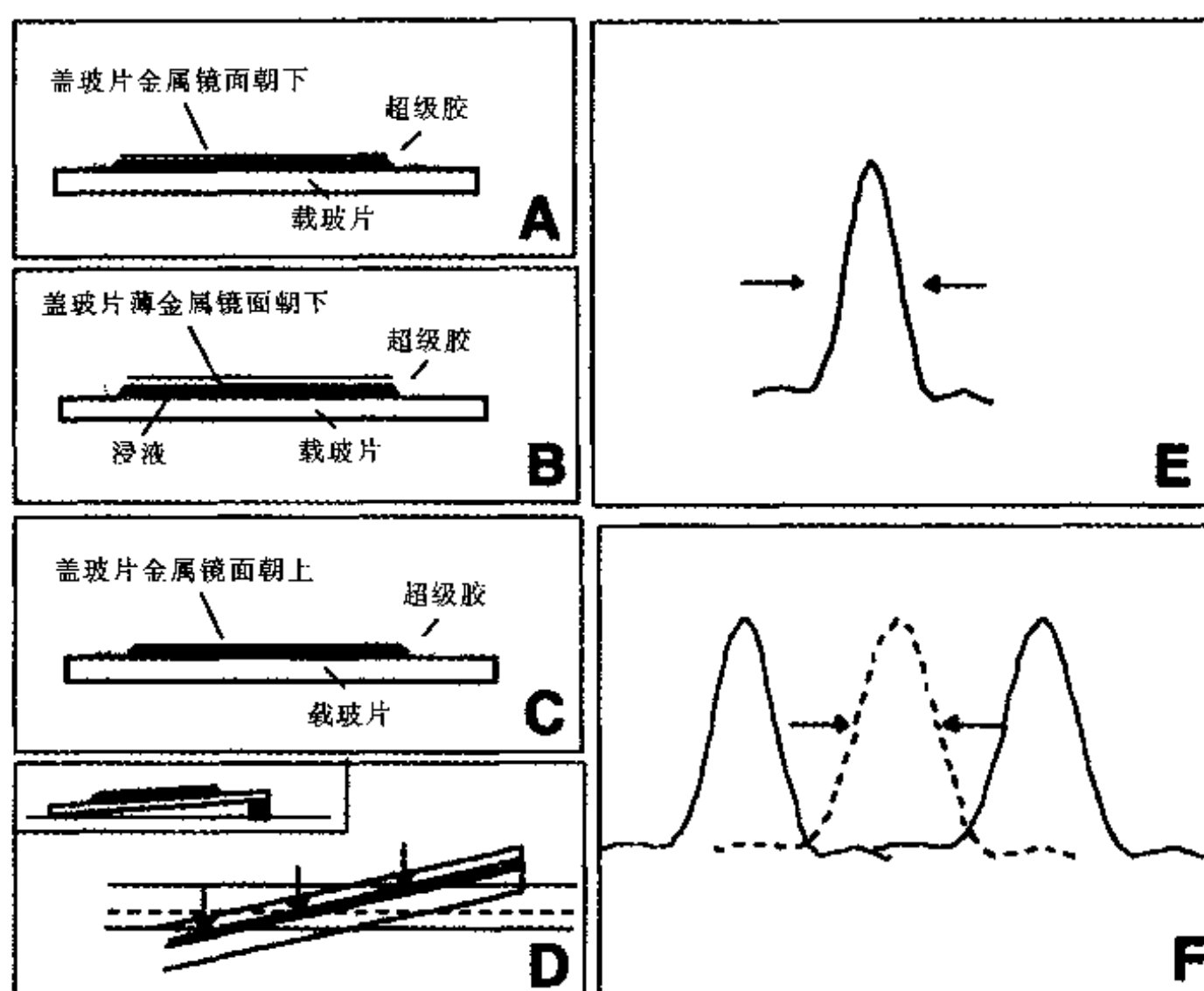


图 7-3 测量共聚焦反射平面反应函数 (PRF)。A: 盖玻片表面喷涂全反射镜的侧视图, 镜面向下封固在载玻片上; B: 半反射镜封固在载玻片上浸液介质中; C: 类似 A, 但适用于被校正为不用盖玻片的物镜; D: 测验样品倾斜方案 (插图), 箭头所指为倾斜反射镜面与水平光学切面的相交切面 (实线), 两个焦点位置 (水平实线) 为校准切面, 区域中心 (水平虚线) 为测量轴向反应的切面; E: 从穿过 A 的垂直 (X, Z) 切面提取反射 PRF, 箭头所指为 50% 强度点之间峰的轴向宽度; F: 从 D 的对应水平 (X, Y) 切面提取的反射 PRF 图, 箭头所指为中间峰的 50% 强度点之间轴向宽度, 此峰对应于实验决定的反射 PRF 测量

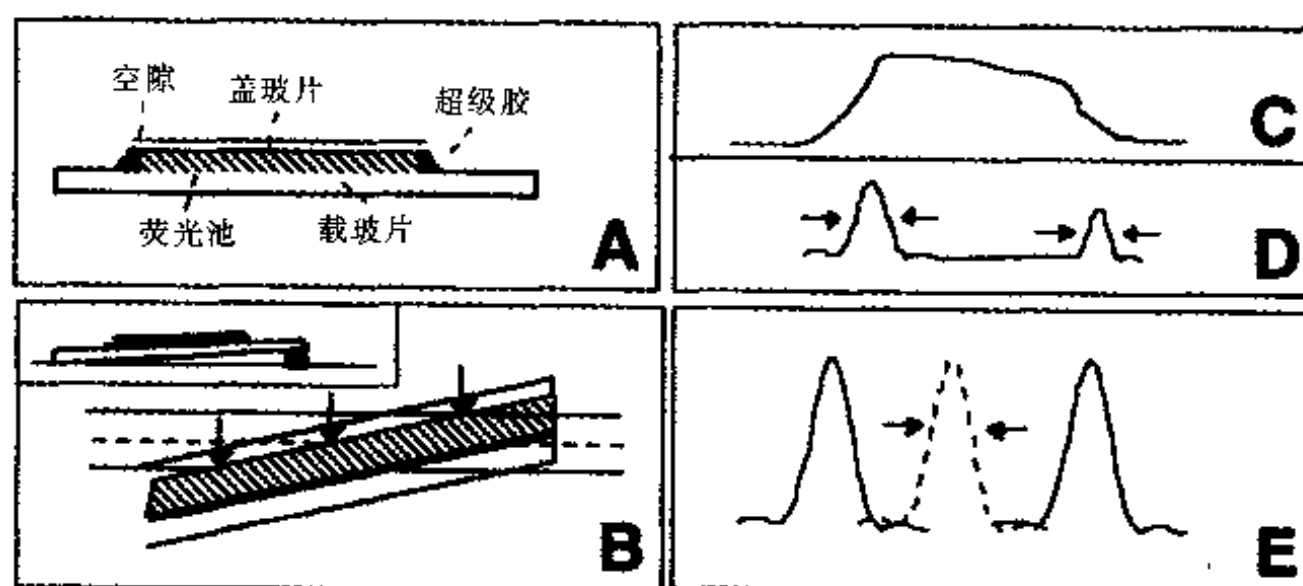


图 7-4 测量共聚焦荧光平面反应函数 (PRF)。A: 介于盖玻片和载玻片之间荧光介质; B: 测验样品的倾斜面 (插图), 箭头所指为水平光学切面与盖玻片表面和荧光介质 (阴影带) 的相交切面, 两焦点处为校准切面 (水平实线), 区域中心为轴向反应测量切面 (水平虚线); C: 从穿过 A 的垂直 (X, Z) 切面提取的荧光轴向反应; D: 对 C 轴向反应进行微分得到的荧光 PRF, 箭头所指为对应于盖玻片/介质 (左) 和介质/载玻片 (右) 界面的峰值的 50% 强度点之间宽度; E: 从 C 的对应水平 (X, Y) 切面提取的荧光 PRF 图。箭头所指为中间峰的 50% 强度点之间宽度, 其对应于实验决定的荧光 PRF 测量

(3) 挖空中间部分 (约 10mm×10mm) 形成一浅室, 见注意事项 3;

(4) 加适量荧光素溶液, 避免溢浅室;

(5) 小心放置盖玻片于浅室上, 避免产生气泡;

(6) 超级胶封片。

6. 采用动态聚焦收集轴向反应 共聚焦显微镜聚焦一般由一个马达控制, 步进距离 50~100nm 左右, 当通过显微镜传输到样品时, 载物台机械性移动的精确度往往达不到要求 (即使有温度控制), 但用这个办法可以估计轴向性能 (图 7-3A 和 7-4A)。

(1) 设置需要的显微镜条件, 保证系统安置正确;

(2) 在显微镜载物台上小心封固反射或荧光测验样品;

(3) 收集垂直 (X, Z) 切面或穿过边界的 3D (X, Y, Z) Z 系列, 对于低 NA 镜头或在非理想条件下, 开始应在每一边上扫描数个毫米, 以获取全部轴向反应, 见注意事项 4;

(4) 测量穿过边界的 Z-剖面强度 (在 X/Y 平均以减少干扰) (图 7-3E 和 7-4C)。

7. 从荧光轴向反应提取 PRF PRF 由荧光 Z 逐步-反应的第一差别 (级差) 估计 (图 7-4C, D)。

(1) 输出边界剖面到表格程序;

(2) 产生级差图 (如相邻点之间的区别)。

8. 用单一 (X, Y) 切面收集轴向反应 当 Z-反应必须被反复评定或要比聚焦步进精度的更精确时, 可应用 (X, Y) 扫描。通过轻度倾斜测验标本, 边界平面便穿过横于视图区域的焦点 (图 7-3D 和 7-4B), 穿过边界的 (X, Y) 切面产生 Z-反应, 见注意事项 5 和 6。

(1) 设置所需成像条件, 确保系统正确配置;

(2) 在测验载玻片的一端贴附垫片 (1mm);

(3) 用已知的倾斜校准: mm (Z) 每像素 (X, Y) = 倾斜差 / (X, Y) 像素大小 (mm);

(4) 用不同焦平面 (df) 的两个 (X, Y) 切面校准: mm (Z) 每像素 (X, Y) = df (μm) / 两边界线中心之间的距离 (图 7-3D, F 和 7-4B, E);

(5) 保存校准值作为成像 X 增量, 用于转换以后的测量值;

(6) 收集边界在区域中心的 (X, Y) 切面, 测量横过边界的强度 X-剖面 (在 Y 轴上平均以减少干扰) (图 7-3D, F 和 7-4B, E)。

9. 从 PRF 数据提取光学切面厚度 完整的光学切面是 PRF 中间峰两边的第一个最小值之间的距离, 实际中用 50%强度点之间的宽度 (图 7-3E, F 和 7-4D, E)。

10. 最佳共聚焦光圈设置 当光圈关小时共聚焦成像可以有三种变化: 第一, 焦点外模糊影稳定降低, 产生更好的对比; 第二, 在最佳对比附近 (在理想条件下), 分辨率将提高到一最终值, 并且进一步关闭时也不再变化; 第三, 光强度明显降低。切面和分辨率与信噪比有关, 必须依靠经验决定。测量软骨组织细胞体积时, 每个细胞约需要 15~20 个切面 (10μm), 聚焦步进应为切面厚度的一半 (如 0.5μm 步进, 1.0μm 切面)。共聚焦光圈的设置是非常重要的, 因为其影响①切面厚度; ②信噪比; ③分辨率/对比度; ④深部衰减。优化生物学实验应从测验样品开始。

(二) 软骨组织准备

(1) 从猪掌关节嵴切取 20mm×10mm×3mm 的软骨组织, 见注意事项 7;

(2) 延纵轴切取 1mm 的薄片, 悬浮于标准 HEPES 缓冲 DMEM 培养液。

(三) 活体染料加载

(1) 组织放入 4.5μmol/L CMFDA 的标准培养液中, 37℃孵育 15min, 见注意事项 8;

(2) 在新鲜培养液中清洗;

(3) 静置 10min, 保证所有的染料酯被细胞内酶分解。

(四) 将组织封固于观察室

1. 将组织放入观察室中进行灌注 (2ml/min);
2. 将观察室固定于显微镜样品台上;
3. 灌注时, 新鲜的培养液从靠近盖玻片的观察室入口处灌入, 用过的培养液从室顶吸出。

(五) 优化图像采集

1. **荧光图像统计: 避免帧测饱和** 对定量图像, 所有的信号都必须调节在帧测限度之内 (如 8 bits, 0~225 像素)。

- (1) 聚焦到小室的盖玻片, 扫描单一 (X, Y) 平面, 不作平均;
- (2) 每次扫描后绘制像素强度分布的直方图;
- (3) 调节黑色背底水平, 使所有强度记录都高于灰度值 15;
- (4) 调节增益和 (或) 激光强度, 使最大强度直方图低于 240;

(5) 选择一个范围核对显示 LUT 指示这些界限, 如绿色 (0~15), 灰色范围 (16~239), 红色 (240~255), 保证没有单个像素 (非平均扫描) 被着色。

2. 图像采集条件

(1) 用功率测量计在样品处测量光强 (生理性标本一般为 20~100 μ W), 控制激光功率 (直接控制或用全色 [ND] 滤光器);

(2) 反复此过程以调试设备: 目的是收集组织或荧光团都不断裂的 4D 图像, 并且用同质区域的平均密度/方差评定信噪比;

(3) 通过独立调整帧幅和扫描速度/像素驻留时间设置帧速率;

(4) LSCM 提供许多不同的定时模式, 可选择 3D (X, Y, Z) “Z-系列”成像和在不同时间点的自动/手控重复或 4D (X, Y, Z, T) 成像 (如果系统支持此功能);

(5) 设置帧平均来平衡降低干扰 (s/n 以帧数的平方根为倍数提高) 与图像漂白及即时分辨率的矛盾, 见注意事项 9 和 10。

(六) 实验方案: 软骨细胞体积原位调节

以下为不等渗条件下原位收集穿过软骨细胞的 4D 图像的方案, 从渗透静息期开始, 加载短暂的肿胀刺激, 然后高渗收缩, 最后调整性体积增大。

- (1) 如前述封固软骨;
- (2) 设置显微镜为荧光模式, 确保增益和黑色背底水平在所成图像的样品区域有正确的设置;
- (3) 用标准 DMEM 灌注 (280 mmol/L), 收集 4D 系列的初始 3D 图像;
- (4) 用低渗溶液替换培养基: 肿胀刺激 (140 mmol/L);
- (5) 间隔 5min 采集一幅 3D 图像, 共采集 10min;
- (6) 用高渗溶液替换培养基: 收缩刺激 (380 mmol/L);
- (7) 间隔 2min 采集一幅 3D 图像, 共采集 15min;
- (8) 为保证所做制备物有生理意义, 3D 图像采集应在 30min 之内结束;
- (9) 结果为一组 4D 图像, 包括 10~12 幅系列 3D 图像。

(七) 样品对成像的影响及校准样品引起的误差

1. **校准轴向衰减** 准确纪录活体数据收集过程, 保存所有条件是十分重要的, 这样校准才能有意义地应用于 4D 数据。影响轴向衰减的因素有: ①物镜; ②针孔; ③激发光谱/发射光谱; ④组织。

最好用同样的组织作校准 (如在每次实验结束时), 但精确的衰减评定需要荧光素浸透软骨, 这需耗时 48h 因而取材部位必须准确地浸透以定位用于校准的相同区域。

- (1) 4%多聚甲醛 PBS 溶液固定组织 (软骨组织固定 24h, 其他组织需时较少);

- (2) 在 $50\mu\text{mol/L}$ 荧光黄中孵育 48h, 保证染料浸透, 见注意事项 11;
- (3) 封固组织于充满新鲜荧光素溶液的观察室中 (图 7-5A);
- (4) 设置显微镜增益和背底水平;
- (5) 在实验 Z-范围上收集 2D (X, Z) 切面或 3D (X, Y, Z) 图像;
- (6) 测量图像的黑色背底水平作为无激光照射时平均强度;
- (7) 穿过垂直切面采集图像 (在 X 向的同质区域平均), 输出到表格程序;
- (8) 从强度剖面的所有值中减去平均黑色背底;
- (9) 以组织中的第一点为基准, 标准化强度值, 将得出光学相对轴向强度变化 (图 7-5B);
- (10) 确定标准化数据的曲线方程参数 (如二次方程式: $Y=ax^2+bx+c$) (图 7-5B);
- (11) 减去所有图像的黑色背底水平并除以 Z-位置的衰减值 (图 7-6)。

轴向衰减校正的步骤: 固定组织→增加组织通透性 (组织穿透)→荧光染料浸透→采集 XZ 切面→测量样品不同深度的荧光强度值→减去背景→数据标准化→确定二次方程式→转换方程式=Z-衰减校正→应用于原始数据。

2. Z-焦点扭曲的校准 生物材料的折射和散射边界导致共聚焦显微镜明显的图形畸变, 当从物镜或标本来的球形波通过有不同屈光度的浸液界面时发生轴向焦点移位和衰减。有水平平面或其他连续屈光指数边界的标本都可能产生这种影响, 在样品中测定的距离必须校准, 校准因素为样品屈光指数除以浸液屈光指数。对某些浸液和培养液或样品的组合, 这一因素可能与共聚焦显微镜的这一比率有高达 5% 的不同, 有时屈光指数无法得知, 这种情况下主要依靠经验确定。

(1) 同前述方法准备荧光素测试样品室, 但应有足够的厚度以容纳 $100\mu\text{m}$ 厚的组织块 (在其上下有数微米介质即可);

(2) 将样品置入小室的一半, 充满培养液并封片;

(3) 收集通过盖玻片、组织、载玻片 (组织下) 的反射 PRF 剖面 (同前述), 使用做生理性实验的物镜 (图 7-5C);

(4) 用盖玻片校正的水浸液物镜重复以上步骤, 做穿过小室无组织部分的 PRF 剖面, 见注意事项 12;

(5) 测量组织部分的两个介质/玻璃界面和参考部分之间的距离;

(6) 测量标本上下的 PRF 指示的光学切面宽度, 见注意事项 13;

(7) 步骤 (5) 中距离的比率产生 Z-焦点误差 (应用于所有 Z-距离的因素);

(8) 步骤 (6) 中估计值的差别为切面扭曲的估计误差。

3. 共聚焦、光学切面厚度、对象大小 对体积的测量要求光学切面厚度大大小于对象的尺寸。共聚焦成像可以被描述为观察对象内的每一个荧光点被替换为或成像为有显微镜分辨度的体积成分, 亦即在 (X, Y) 面有几百纳米 (依赖于物镜的数值孔径和共聚焦光圈), 在 Z 轴有光学切面厚度。由于切面厚度总大于 (X, Y) 面分辨率, 因而主要的误差是观察对象 Z-轴向的误差, 至少达一个光学切面厚度。在对象边界, 其精确依赖于边缘的曲率半径与显微镜分辨率的比, 这在低 NA 物镜、大共聚焦光圈可以导致体积的过度估计, 唯一简单的解决办法是用高一些的 NA 物镜和 (或) 小一些的共聚焦光孔, 如果做不到, 组织深度超过几百微米时, 就必须考虑另外两个选择, 第一, 使用计算机软件 (如卷积) 部分重建对象的正确尺寸; 第二, 更为实际的方法, 用同一成像方案测量与你的细胞有相同形状和大小的测试物体, 通过求测量尺寸与用光散射、Coulter Counter 等方法独立得出的估计值的比, 就可以得到体积夸大的粗略情况并校准。用高 NA 物镜对一个有代表性但较薄样品的成像, 也是一个校准方法。

轴向聚焦校正步骤: 穿过测验样品和组织的 X, Z 反射图像→穿过参考区的 X, Z 反射图像→测量样品的峰峰距离→距离之比=校正参数→应用于校正原始数据。

(八) 分割: 细胞边界的客观确定

为准确测量标记细胞 (阳性或阴性) 的体积, 必须客观估计细胞的边界位置, 用于分割对象的阈值

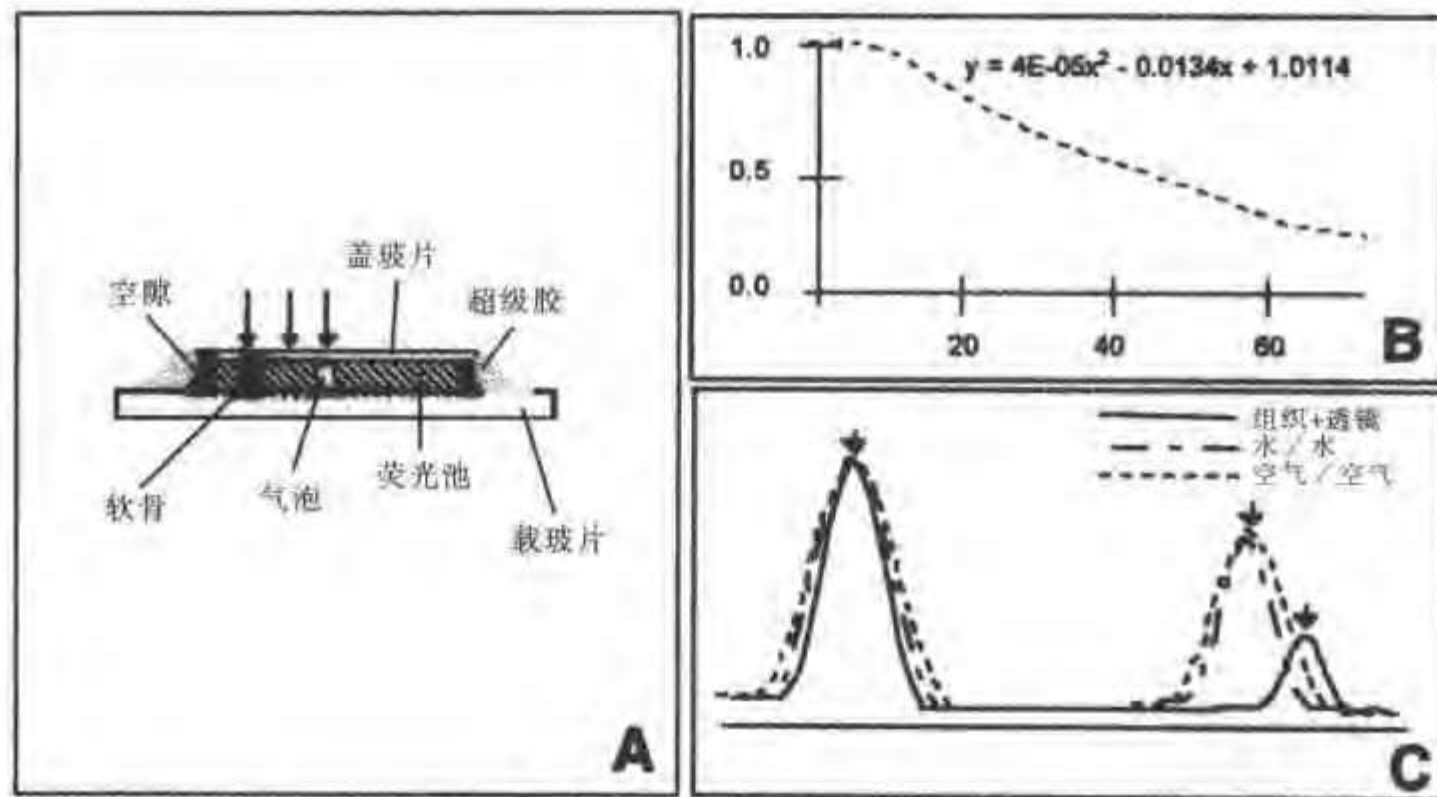


图 7-5 校准标本引起的衰减和轴向焦点扭曲。A: 荧光测验标本 (同图 4) 加入生物性材料和参考物 (荧光池或气室)。B: 通过荧光黄浸染的软骨测量轴向荧光衰减反应, 以组织最顶部荧光强度为标准, 进行荧光强度标准化, 将参数显示在 Microsoft Excel 中。C: 穿过生物材料 (实线) 和参考区 (虚线) 的轴向反射 PRF 图, 箭头所示为对应于盖玻片/介质 (左) 和介质/载玻片 (右) 界面的峰

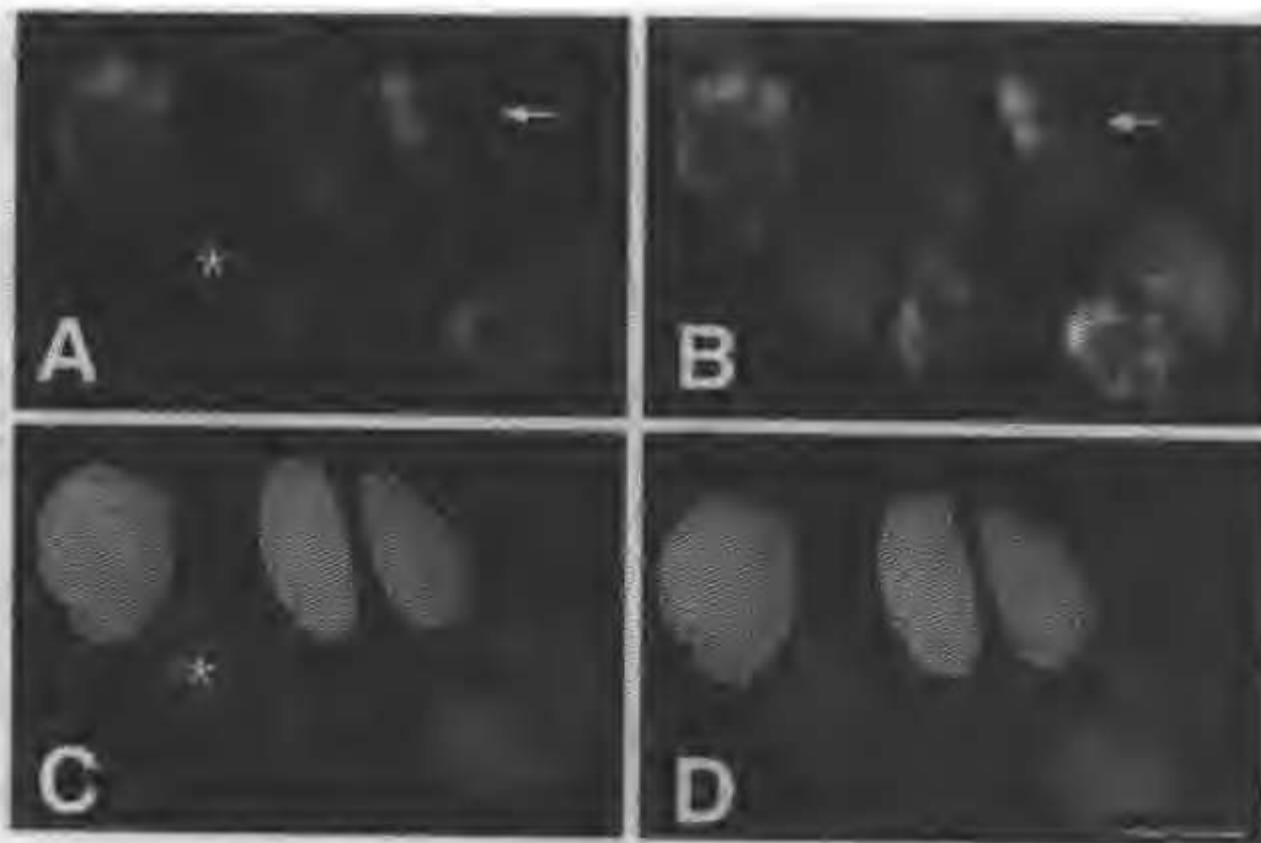


图 7-6 软骨标本中原位软骨细胞, 样品导致的轴向衰减校正。A: 单个未校正的 3D 时间点的最大投影, 星号显示荧光强度较低的一个细胞, 在组织内的位置比周围细胞更深, 箭头所示为靠近组织表面的更亮的细胞; B: 轴向衰减校正后的 A 图像, 靠近组织表面 (箭头) 和较深处的细胞有相近的荧光强度; C: 是 A 图的突出编码投影, 星号为深部细胞由于轴向衰减导致不正确成像; D: 是 C 经轴向衰减校正后的情况

对外观体积的影响是非常显著的, 阳性标记的边界位置是在最大强度 (肯定在细胞内) 和最小强度 (肯定在细胞外基质) 之间。

1. 用荧光珠定义边界阈值规则

- (1) 用 Coulter Counter 方法找到荧光珠直径平均值 (约 $7\mu\text{m}$) (图 7-7A);
- (2) 获得贴附于盖玻片并用 0.1% (w/v) 多聚赖氨酸包埋的珠粒的 3D 图像;

- (3) 选择穿过珠粒中心的切面;
- (4) 测量珠粒内和背景区域的平均强度;
- (5) 以超出背景最大强度的百分值作为强度阈值, 亦即 $X \cdot (I_{\text{细胞}} - I_{\text{背景}}) + I_{\text{背景}}$, 如: $X=0.3-0.7$;
- (6) 产生图像数据的最大 Z 投影 (见以下 3D 成像);
- (7) 设置所有低于 X 的像素值为 0, 所有高于 X 的值为 255, 使投影图像二值化;
- (8) 获取珠粒直径的估计值 (横切面面积/3.1416), 绘制直方图 (图 7-7);
- (9) 比较从共聚焦显微镜得来的直径和 Coulter Counter 直径的分布情况。

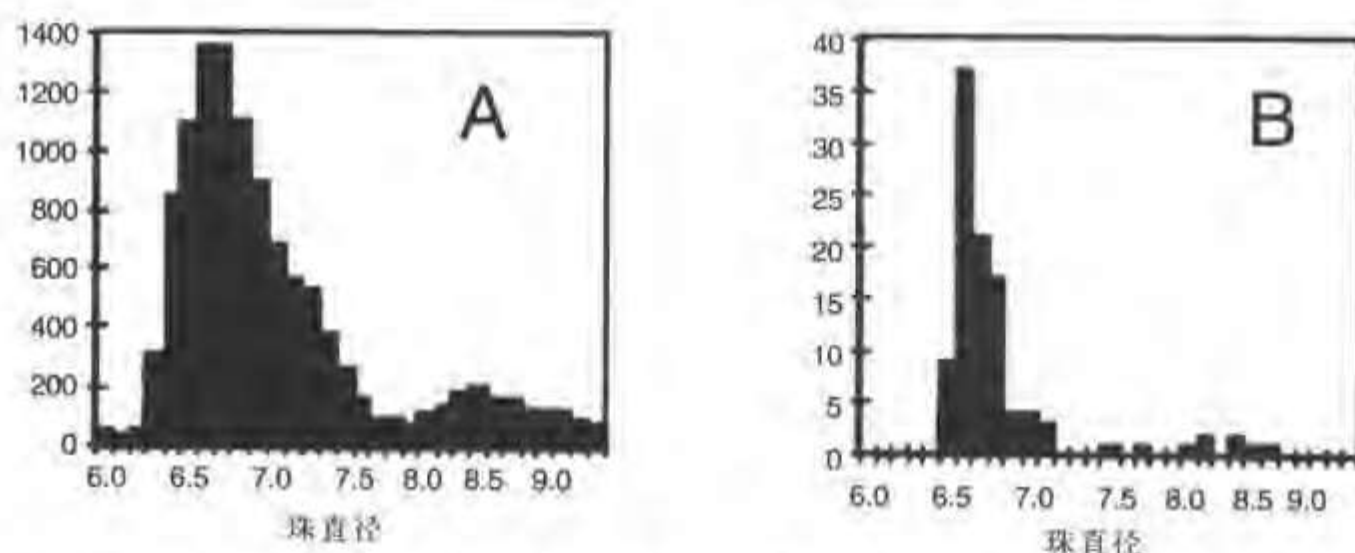


图 7-7 Coulter Counter 法和共聚焦显微镜确定的 $7\mu\text{m}$ 荧光珠直径, 珠粒直径分布的直方图 A: Coulter Counter (众数=6.64); B: 共聚焦荧光显微镜 (众数=6.6)

Coulter Counter 法得到的 $7\mu\text{m}$ 珠粒直径与共聚焦显微镜得到的直径值 (50% 阈值) 有很好的相关性, 见注意事项 14。

2. 软骨细胞数据的分割

(1) 从软骨图像分割 CMFDA 染色的细胞 (同前述珠粒校准), 逐个细胞确定背景和细胞的强度, 避免不均匀染色导致的误差;

(2) 获取在 $50\% \pm 1\text{SD}$ 细胞强度的边界阈值的可信限, 例如, 50% 阈值:

- ① $0.5 \times (I_{\text{细胞}} - I_{\text{背景}}) + I_{\text{背景}} = (I_{\text{细胞}} + I_{\text{背景}}) / 2$
- ② $(I_{\text{细胞}} + I_{\text{背景}} + I_{\text{标准差}}) / 2$
- ③ $(I_{\text{细胞}} + I_{\text{背景}} - I_{\text{标准差}}) / 2$

(九) 提取细胞体积的两个方法

可以用分割阈值在 3D 或 4D 图像系列中测量体积。

1. 横切面面积总计 对于测定范围内的每个细胞 (图 7-8A):

- (1) 分析通过细胞的 (X, Y) 光学切面;
- (2) 以像素或 mm 确定在阈值强度之上的横切面面积 (图 7-8B);
- (3) 确定两个可信限的横切面面积;
- (4) 总计细胞所有切面的面积;

(5) 通过用 X, Y 乘积得到的像素面积乘以 Z 像素间距或用面积 mm^2 乘以校正的 Z 间距得到每个细胞的体积 (和可信限), 见注意事项 15。

2. 3D 分割 一些软件可以不单独处理每个切面而自动分隔 3D 对象, 这些软件应用阈值或其他边界条件算法, 寻找互相连接的图像体素 (voxel), 不同的版本允许的相邻体素连接性程度不同, 其中播种填充算法时在对象内部从手工或自动半自动确定的播种位置开始, 填充对象到边界并显示体积 (图 7-9)。

(十) 形象化体积数据

一个典型 4D 共聚焦显微镜影像收集的数据量 (每个实验常常为几十或几百兆) 使数据分析、处理、

可视化遇到许多逻辑问题,所以多维可视化是重要的数据减少的方法,一个3D数据或4D数据必须缩小为2D视图,才能在监视器、打印机、幻灯片上显示,计算机或电视屏幕等显示系统允许2D视图顺序显示,而且大部分可以用3D功能帮助这些数据的解译。可视化需要将3D/4D数据投影到一个或多个2D平面上,数据再现为可以播放的视图并保留其重要特征,可以演示给观众,并用附加的数据保存原始数据的3D/4D本质。我们力争最有效的使用现有显示资源,用最简单的投影和表现方法,来使观众用最少的曲解来最大限度地理解他们看到的东西。

典型的共聚焦资料可视化过程一般从简单的切面动画进展到混合应用立体和其他演示技术的数据投影。

1. 演示4D图像数据的2D切面

(1) 确保图像依正确比例填充到显示设备的范围内(8bit资料用0~255灰度),测量最小和最大强度(整个图像),然后或重新调节所有的值或简单的用强度界限控制显示查阅表(LUT),见注意事项16;

(2) 在资料格式和(或)显示软件中设置正确尺寸(以 μm 计的X, Y, Z像素尺寸),否则超出显微镜软件或计算机系统范围的图像而不能保留正确的比例,特别注意轴向已作校正;

(3) 用切面演示/动画工具显示序列视图,使之仿佛沿三个主要的数据轴聚焦,有些程序包只能以(X, Y)切面在Z轴或(X, Z)切面在Y轴作快速动画演示,大多程序可以在任何角度进行切面动画演示,见注意事项17;

(4) 用切面动画工具演示某一Z聚焦位置的时间序列动画,如果软件无此功能,可重新排列数据成为有时序性的(X, Y)、(X, Z)等切面的系列文件,使每个文件对应于一特定的聚焦水平,而不是一个时间点。

2. 单纯3D投影 在2D视图中每个像素只需要一个值,3D投影时,体素沿视图方向被处理成拥有单一值的像素(图7-6和7-9),单纯射线投射投影的处理方法包括最大亮度(如对表面反射,荧光染色稀疏等情况)或平均值(是制作初始视图无偏好方法),投射后需重新调节视图以获得最适对比。

(1) 用可视化程序包的单纯投射函数制作4D文件中每个3D时

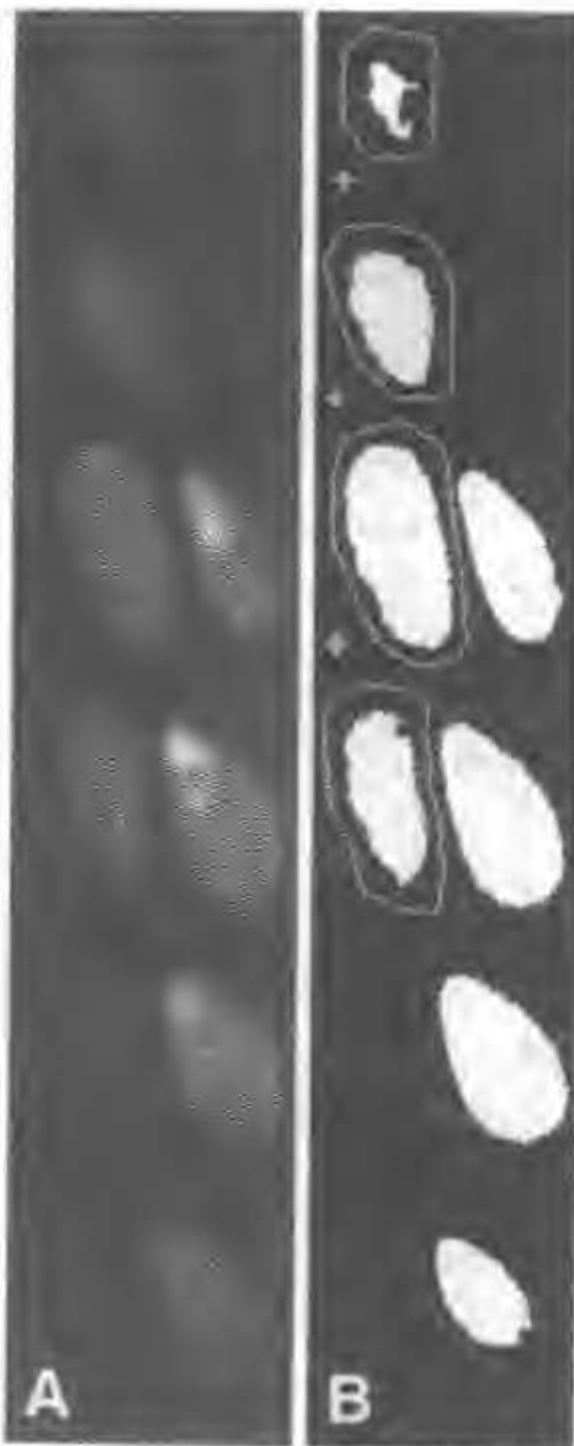


图7-8 用光学切面原位测量软骨细胞体积,穿过两个用CMFDA荧光染色细胞的6张光学切面。A:原始图像数据;B:用基于背景和平均细胞强度之间50%强度阈值二值化后的图像数据

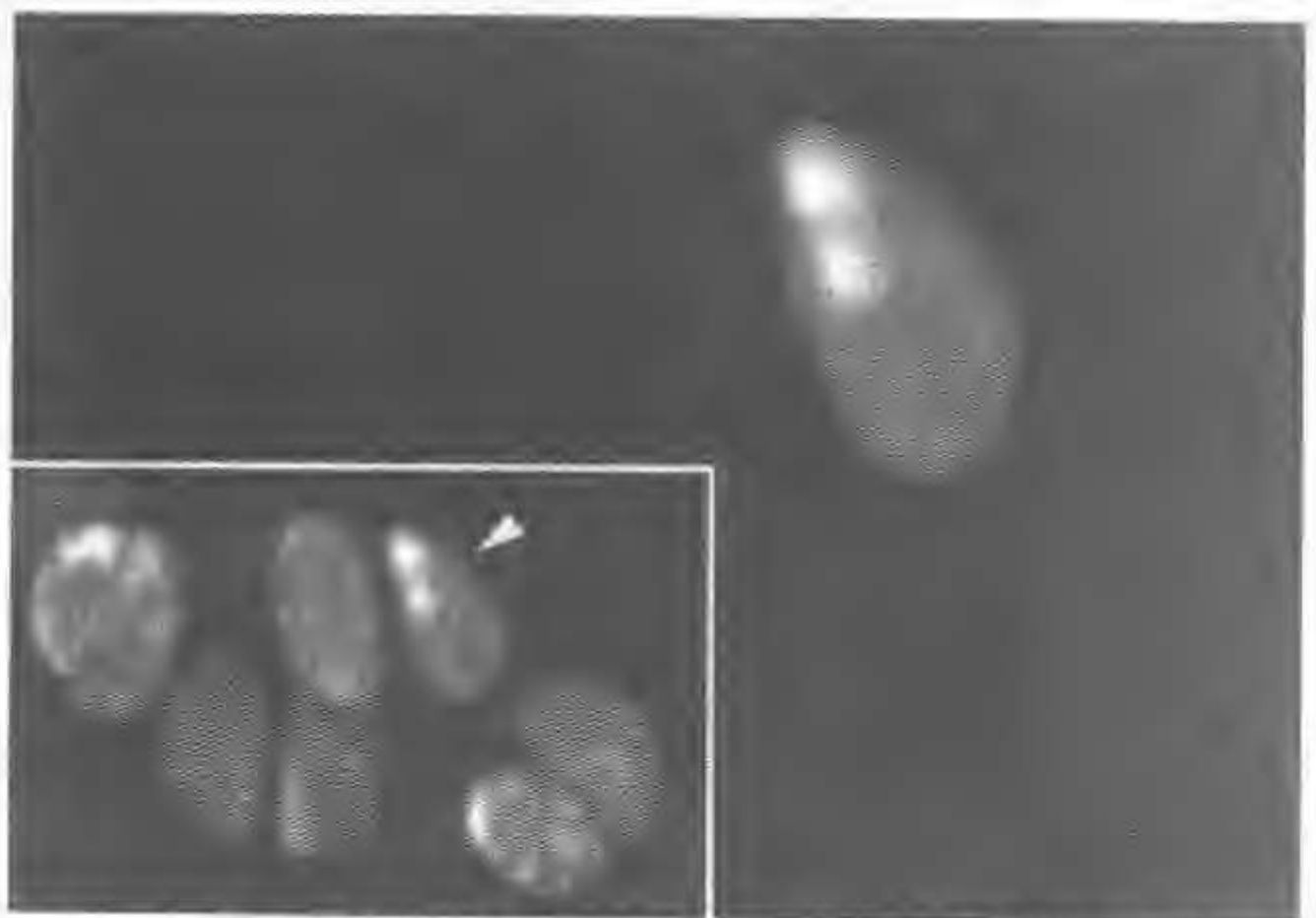


图7-9 播种充填法测量原位软骨细胞体积,3D共聚焦荧光图像的最大投影,用体素播种充填法从一个时间点(插图)提取的单个细胞

间点的单一 2D 视图，存储在单一文件中，然后制作时间系列动画，见注意事项 18；

(2) 用投射工具制作一个 3D 时间点多个方向的 2D 视图（如倾斜和（或）旋转）。

3. 体素表面可视化：高度或深度视图 为将深度保存于视图中，一些程序可提出距观察者最近的体素，使产生一种表面效应（但不必假定与邻近体素有必要的连接），表面体素通过其原始强度或其对应深度、高度或数据性体积中 Z 坐标的亮度显示，表面投射模式的作用是隐藏结构之后和（或）之中的数据，传输实体特征到视图中，在做实体重建前一般先用切面动画工具来观察整个数据。

(1) 调出 CMFDA 染色细胞的 4D 图像边界阈值的客观估计；

(2) 用这些值作为表面或高度投射的表面阈值，见注意事项 19；

(3) 用可视化工具在每个 3D 时间点制作一个表面视图，制成动画显示细胞随时间的形态变化（图 7-10）；

(4) 用颜色代表体素的高度，用彩色显示 LUT 来凸显前面、中间或后部等处的细胞，预先设置 LUT 以类似于地图标准的地理颜色（如蓝/黑代表谷地，红/灰代表山峰等），来显示局部形态特征。

4. 更先进的可视化工具 阿尔法混合是与前述投影技术类似的工具，其使用射线投射，朝向或背向观察者，2D 视图中高暗度体素呈现为靠近前面的实体面貌，朝向后部的亮体素通过前面更透明的部分显示出来。阿尔法混合需要仔细控制阿尔法函数，此函数用于使数据值映射为透明的性质，从而赋予原始数据人为的材料性质，阿尔法函数必须通过透视视图测试，否则不能区分暗体素和被不透明结构遮蔽的亮体素。

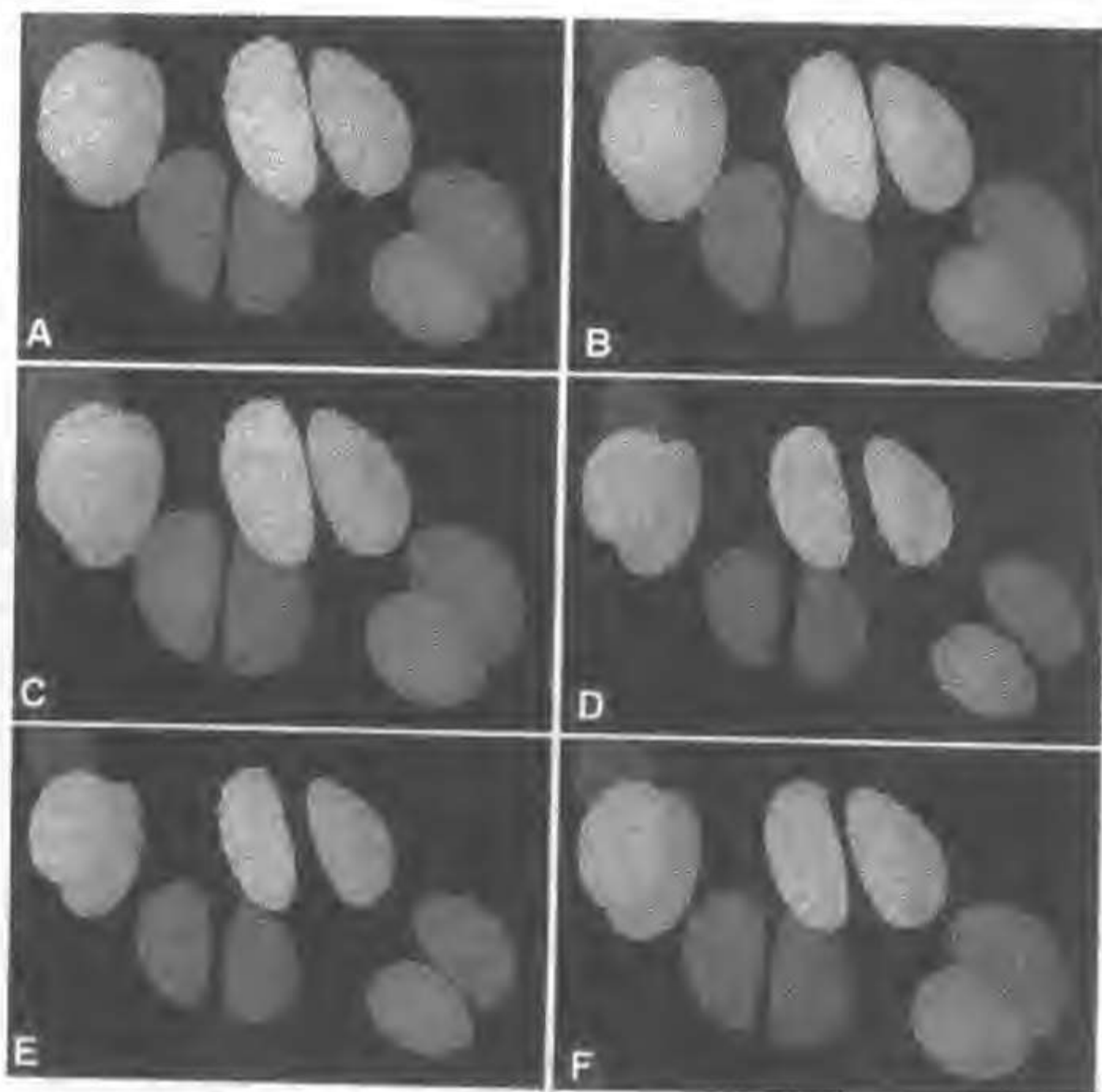


图 7-10 经历体积调节的软骨细胞原位 4D 可视化，在加载渗透压负荷的生理学实验的 1h 内测 6 个时间点（A-F），每个时间点的 3D 共聚焦荧光图像被可视化为高度代码投影。A: 0 min (280 mosmol/L)；B, C: 5~15 min (140 mosmol/L 低渗肿胀刺激)；D: 20 min (380 mosmol/L 高渗收缩刺激)；E, F: 25~60 min (380 mosmol/L)，调节性体积增大的细胞反应

可用另一种方法可视化软骨细胞体积数据,联合应用平均投射(转化原始荧光强度值)和表面可视化(显示前面的细胞,遮蔽后面的细胞),设计用颜色代表细胞体积相对变化的第二种 4D 重建方法,并对比个体和群体体积,以下是具体方法:

(1) 用前述边界阈值产生每个时间点的高度编码视图;

(2) 在逐个像素处理的基础上,用高度图像界定一个参考表面,在其附近应用有限的或局部的平均强度投影(亦即从前面的一些体素到表面后的一些体素),显示平均荧光强度的围绕细胞外部区域的层面,通过提高投影距离使细胞变得更加透明,见注意事项 20;

(3) 将这些重建制成动画(旋转、倾斜等方式或按时间变化)来观察细胞的染色形式和在组织中的排列。

5. 用色彩深度显示细胞体积

(1) 依次播种充填每个细胞(如前述),并用前述两个方法将每个细胞的体素透视到视图中;

(2) 当结果建立起来时保持高度(Z-坐标)视图;

(3) 以第一时间点体积为基准将每个细胞的体积转化为相对体积;

(4) 产生每个细胞的高度视图(Z-坐标);

(5) 当每个细胞透视到视图中时,比较高度视图与最后结果,只有最前列的体素被显示,这样前面的细胞遮掩了后面的细胞;

(6) 将视图制成 24-bit 彩色图像,每个体素对应投影亮度的强度,投影根据 RGB 彩色比率均衡在三个频道中,面 RGB 彩色比率是将相对细胞体积通过彩色 LUT 以提供必要的红、绿、蓝成分而获得的;

(7) 观察一个时间点的 3D 图像,看每个细胞的相对体积;

(8) 制作一个时间点的转动系列来观察详细的细胞 3D 位置及其相对体积的关系;

(9) 制作每个时间点的体积编码重建系列动画,观察以不同颜色转换显示的动态体积变化,能看到在单色视图中不明显的细微体积变化;

(10) 最后,用生理实验中相对体积的地形图与每个可视化时间点图像合成一幅混成图(彩图 2)。

三、注意事项

1. PRF 常与点扩展函数(PSF)混淆,后者是通过亚分辨荧光珠连续切面获得,PSF 剖面产生 Z 轴分辨率和 X/Y 分辨率,面每个平面的总强度产生轴向 PRF,在水性样品中低强度珠粒的布朗运动使这些测量变得不可靠。

2. 如果金属层透射光线射到载玻片,将会反射回来造成干扰边缘,薄的金属层应朝向载玻片封固在浸油中,用超级胶密封(图 7-3B),对 NCG(无盖玻片)物镜,镜面应朝向物镜。

3. 参照染料溶解性资料表(某些染料在水中可能需要 DMSO),罗丹明 6-G, Ex514nm, Em>590nm (Eastman Kodak),可溶于水、甘油、油。

4. 用油镜聚焦使加在样品的力朝向载物台(换言之,在直立显微镜使载物台和镜片相靠近,在倒置显微镜则相分离),如果样品是不可压缩或不可延展的,就应限制轴向误差,必须根据培养液/浸液屈光指数的比调整样品距离。

5. 利用反射 Z-反应峰的锐度仔细调节共聚焦显微镜。

6. 如果载物台与光轴没有完好的正交,第二种方法更为精确。

7. 组织置入生理性培养液中,必须保持细胞处于适当的渗透压,否则切取组织往往导致组织肿胀,所以用蔗糖和氯化钠用来提高培养液渗透压,HEPES 可在实验过程中省去提供二氧化碳的必要,并缓冲 pH 值使组织不暴露于酸性溶液中。

8. 其他染料(如 BCECF、钙黄绿素)可以用于测量体积,但在组织肿胀和恢复过程中染料容易泄漏或被泵出细胞,CMFDA 由于与细胞内硫醇共价结合得以较好的保存,为避免在高染料浓度时破坏细

胞功能,要确保在优化显微镜条件前加载的上限与正常生理情况一致,这就需要在加载和未加载的细胞内有客观的功能标志,如膜电位和完整性(如碘化丙锭)、胞浆流(cytoplasmic streaming)、代谢活动、生长率等。ECM 除大分子外还有高电荷的糖蛋白,并且细胞可能排出分解染料酯的酶,所以加入酶抑制剂(如蛋白水解酶)可以加强染色。

9. 目前并不清楚单一慢扫描和整合的快速扫描谁是最好的信噪比/细胞活力方法,一般依赖于荧光染料缓解时间,并且环境对其也有明显影响。

10. 已知用 MRC600 做的许多 4D 生理性软骨实验使用了 $25\times 0.8\text{NA}$ 物镜,图像尺寸为 $768\text{ 像素}\times 180\text{ 线}\times 40\text{ 帧}$ ($0.21\mu\text{m}\times 0.21\mu\text{m}\times 1.0\mu\text{m}$ 体素),扫描速度为 3 帧/秒,两帧整合,1h 内每 2~5min 重复此 3D 图像,激光强度(在样品处)为 20mW 左右,细胞内染料(CMFDA)浓度约 5mmol/L,共聚焦光圈约 2mm。

11. 选择荧光黄是因为其荧光类似 CMFDA,但与 CMFDA 不同的是其染色固定的细胞,严格来说,衰减剖面图是从盖玻片/培养基边界开始的,应包括样品上的培养基。如果标准化到样品本身的顶部,就应该在组织位于与盖玻片相同距离的位置时收集实验数据,对水浸液或低 NA 物镜,这个误差是很小的。

12. 如果没有 CC 水浸液镜片,当制作样品并使用空气镜片成像时,就必须通过包埋在介质中的气室做参考切面(图 7-5C)。

13. 样品上下 PRF 的总体强度对应于事先确定的衰减曲线,任何差异都反映了由固定引起的细微改变。

14. 用微珠校准 CLSM 的轴向尺度(包括体积)时应小心,一些珠粒有显著高子水的屈光指数(常超过 1.6),这会起到类似镜片的作用,可聚焦光线、延长珠粒测量的外观轴向尺度以及使轴向不对称的模糊。

15. 一些软件包可以半自动或全自动的切割横切面,如果物体在轴向非常平坦,可用(X,Z)切面(避免结构顶部和底部的显著误差)。

16. 对 8-bit 图像,软件包可以允许图像值以几种方式呈现在屏幕上,最简单的是用灰度(每一值有相同的红、绿、蓝量)直接与体素(voxel)值相关,数据值通过显示 LUT 映射,输出的红、绿、蓝色显示在屏幕上。为加强强度类似的区域,用非线性彩色 LUT 来将亮度映射为特定的色调(组合红、绿、蓝),这样的技术广泛用于显示离子浓度的敏感变化,储存为双波长离子敏感染料的离子发射比率,这种彩色化 8-bit 资料的方法一般被称为“indexed color”。当显示多频道图像(如来自几个共聚焦探头)或从彩色摄像机输出显示时,数据一般以 3 个 8-bit 值形式存在,每个代表一个独立的红、绿、蓝水平,最后的颜色显示不由通过 LUT 的映射值决定,而由改变储存在每个颜色平面的实际值决定,这被称为 24-bit 或真彩色。因为资料的量以及改变显示色彩需改变储存的值,24-bit 彩色显示比 8-bit 索引的彩色显示慢得多,一些软件包将动画显示从 24-bit 转化为 8-bit 索引显示。

17. 以 10~20 帧/秒或更快的速度显示切面动画将产生资料平滑前进的映象,观察者在看到下一帧图像时上一帧仍保留在视网膜,大脑下意识的将邻近的切面联系起来得到连续结构动作的映象,使在单一切面或混成图不易清楚看到的特征变得更容易理解,不过这需要有好的照明、强对比度和好的显示质量。

18. 当演示这个序列的平滑动画时,重建结构将在屏幕上转动,眼和头脑将填平显示视图之间的空间,强化了沿数据化体积外周快速移动或向中心慢速移动的特性。

19. 表面可视化的目的是看到所有细胞的边界及其在组织中的排列方式,这种阈值技术用一个单一值来拣出一个体积中的几个对象,所以需要对一群细胞用一个平均阈值;一些软件包提供更高级的梯度边界操作程序,不需要一个单一阈值,就可以凸显在同一区域的亮和暗的物体,此处提供的体积测量都是用阈值逐个细胞完成的。

20. 可视化的第一部分用了 Bio-Rad Lasersharp 软件的双通可视化模式的一种,用表面每一边的距离作为变量(典型值为每边 5~10 体素)。

第一篇

激光扫描共聚焦显微镜应用

第八章 钙转运的机制和细胞内钙的测定

第一节 钙的转运及其机制

一、钙代谢简述

(一) 钙的重要性与体内的分布

钙是人体重要的元素成分之一，人体内含钙总量约 1 300 g；它又是组成无机盐的重要元素，约占人体无机盐总量的 1/2。钙在生命活动过程中具有极其重要的作用，有多种生理功能，除作为组成骨骼、牙齿的主要原料外，还能降低毛细血管及细胞膜的通透性，参与肌肉收缩、纤毛运动、阿米巴运动、白细胞吞噬、细胞分裂、受精、电兴奋、激素分泌和代谢等过程。

钙在体内以两种形式存在：结合状态和离子状态 (Ca^{2+})。只有 Ca^{2+} 才具有生理活性，所谓 Ca^{2+} 又分为细胞内 Ca^{2+} 和细胞外 Ca^{2+} 两种。研究表明：细胞外液的 Ca^{2+} 浓度约为 10^{-3} mol/L ，细胞内 Ca^{2+} 浓度约为 10^{-7} mol/L 。细胞内 Ca^{2+} 浓度低，仅为细胞外 1/10 000，正是在细胞内 Ca^{2+} 的变化参与下，才会产生上述各种重要的生理反应。多年来人们发现 Ca^{2+} 对神经体液调节具有特别重要的意义，即对兴奋-收缩耦联、神经传导的兴奋-传递耦联、兴奋-激活代谢耦联及兴奋-分泌耦联诸过程均有重要作用。同时细胞本身的代谢调节，也依赖于 Ca^{2+} 的存在。

钙广泛分布于体内各组织器官中。按成人体重 70 kg 计算，所有软组织的钙相当于体重的 0.01% (约 7 g)，细胞外钙相当于体重的 0.0015% (约 1 g)，软组织和细胞外液共含钙约 8 g；牙齿含钙 7 g；其余约占 98.9% (1 300 g) 的钙分布在骨骼中，其钙含量相当于体重的 1.86%。

(二) 体内钙的来源与去路

人类为了维持生命，保证生长发育和健康地从事工作，每天必须摄入一定量的物质，为机体提供必要的营养素，如蛋白质、脂肪、碳水化合物、维生素、无机盐和水等。体内的钙主要来源于食物，含钙丰富的食品有乳类、蛋、贝类、绿叶蔬菜、大豆和豆制品等，其中乳类及其制品含量最多且易被吸收。但必须注意某些植物蔬菜含有草酸，可与钙结合成不溶性钙盐，影响钙的吸收，所以在选择供钙食物时也应考虑配食中的草酸含量。因此，应食用含钙丰富而草酸盐少的蔬菜。

钙的需求量与年龄、妊娠、授乳等因素有关，我国规定的钙日供量：成年男女为 600 mg，孕妇为 1 500 mg，乳母为 1 200 mg。钙在人一生中的不同阶段有不同的需求，婴幼儿期钙的需要量特别高，日供量约 700~1 200 mg，3 岁以后为 700 mg，青春发育期为 500 mg。60 岁以后男女钙吸收减少，但妇女绝经期及其此后固有骨吸收增加，故可有血浆钙增高和尿钙排泄增加。有人报道，绝经后的妇女每日摄取 800 mg 的钙，因较高的尿钙排泄，一般仍呈负钙平衡。随着年龄的增长，可能由于代谢的改变或维生素 D 的缺乏促使钙需要量增加，所以为了维持体内钙的平衡，老年人钙的摄入量应相对增加。

含钙的食物进入人体后，主要由肠吸收，未被吸收的钙经粪便排出，所以说首先是肠发挥了重要的作用；其次是骨，在骨内存在骨吸收和骨形成两种过程：在骨吸收过程中， Ca^{2+} 从骨向细胞外液移动；在骨形成过程中， Ca^{2+} 从细胞外液向骨移动；第三是肾，血液中的 Ca^{2+} 经肾排泄，经尿排出体外。但 Ca^{2+} 对机体非常重要，因此它基本上又经肾脏重吸收。此外 Ca^{2+} 还进出动脉等软组织，总之，由上述诸多器

官组织和细胞调节 Ca^{2+} 代谢。而血中钙离子浓度受各种激素调节并且被控制在一定水平上, 这些激素主要有甲状旁腺素、降钙素和 $1, 25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 等。

(三) 钙代谢的研究方法

由于 Ca^{2+} 在生命活动的各种生理生化反应和疾病的发生、发展中扮演着极其重要的作用, 以及多年来生物医学高新技术和高精科学仪器的飞速发展, 从整体水平至细胞分子水平对钙的研究方法和成果越来越多。在整体水平上如血清钙的测定, 迄今为止国内外大致有 5 种方法: 滴定法、比色法、火焰法、离子选择电极法和活化分析法。滴定法又分为氧化还原法和络合法, 后者是国内应用较普遍的方法之一。比色法有直接比色法和间接比色法, 国内多用间接比色法, 即邻-甲酚酞络合法。火焰法分为火焰光度计法和原子吸收法, 后者比前者效果好。离子选择电极法可测血中离子钙, 它比测总钙更有意义。活化分析法是用回旋器中子轰击试样后用质谱仪测定血钙的方法, 该法用血量少、准确度高, 尿钙的测定多采用与血清钙相同的 EDTA-Na 滴定法。此外还有 ^{45}Ca 放射性核素示踪法, 本法不仅可用作体内钙代谢的示踪研究, 也可作为观测细胞钙流的研究, 是现代比较常用的方法。关于细胞内钙的研究方法, 主要有利用单波长或双波长荧光分光光度计, 应用荧光指示剂 Quin-2/AM 或 Fura-2/AM 测定细胞内 Ca^{2+} 浓度, 这是目前研究 Ca^{2+} 在生命科学中生理生化功能的有力武器。更为先进的方法是利用流式细胞仪或激光显微镜观察单个细胞内的 Ca^{2+} 变化。

总之, 钙对机体极其重要, 分布广泛, Ca^{2+} 调节众多的生理和代谢过程, 特别是在细胞信息传递过程中的作用, 日趋受到重视。 Ca^{2+} 不仅单独作为第二信使起作用, 而且也参与和协调其他第二信使的代谢和对细胞生理功能的调节。

二、血钙的转运及其调节

从胃肠道吸收的钙进入血液循环, 一部分进入骨形成骨盐, 小部分在软组织内分布, 另一部分经肾小球滤过从尿中排泄。正常人的净钙吸收与尿钙排泄值相当, 约为 100~200 mg。细胞外液的钙进入到骨和软组织且以同样的比率返回到细胞外液。细胞外液中含钙约 1000 mg ($1.14 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$), 其中 350 mg 存在于血浆中。血浆钙浓度正常维持在 8.5~11.1 mg/dl 之间, 其中 46% 与血浆蛋白特别是白蛋白结合, 47.5% 为游离钙 (Ca^{2+}), 仅有 6.5% 的钙以磷酸钙、枸橼酸钙、重碳酸钙、酒石酸钙、棕榈酸钙等复合物形式存在。正常人的血浆 Ca^{2+} 不是固定的, 每日可有 $\pm 0.1 \text{ mg/dl}$ 的变化范围。有 3 个主要的靶器官: 肾、肠、骨等与血浆 Ca^{2+} 浓度的体内平衡有关。许多生理因素影响正常人血浆 Ca^{2+} 浓度, 如性别、年龄、运动、妊娠、激素水平等, 甚至血浆 pH 或蛋白浓度的改变等均可对血浆 Ca^{2+} 水平产生一定的影响, 从而使 Ca^{2+} 浓度被控制在一定的水平上。

血浆 Ca^{2+} 浓度下降时, 甲状旁腺立即分泌 PTH。PTH 作用于骨, 促进骨吸收, 从而使 Ca^{2+} 由骨释放入血中。 $1, 25 (\text{OH})_2\text{D}_3$ 在肾脏生成, 这种激素作用于肠, 促进肠道吸收 Ca^{2+} , 也可促进肾脏重吸收 Ca^{2+} , 它还可作用于骨, 促进骨吸收。在此两种因子的作用下, 血浆 Ca^{2+} 浓度上升。在血浆 Ca^{2+} 浓度上升后, 甲状腺的滤泡旁细胞 (C 细胞) 释放出 1 种具有抑制骨吸收作用的激素——降钙素 (CT), 降钙素可使血浆 Ca^{2+} 浓度降低。血中 Ca^{2+} 浓度主要由以上 3 种激素调节, 此外生长激素、甲状腺素、性激素、前列腺素等也有调节血浆 Ca^{2+} 的作用。

(一) 肾脏的作用

1. **血浆钙与尿钙之间的关系** 有人通过正常人注射钙剂研究表明, 注射钙剂后血钙浓度呈进行性增高, 而尿钙排泄率也呈直线上升, 以保持血浆钙的恒定。也有人认为肾小球滤过率 (GFR) 的大小与血浆钙水平和尿钙的排泄有关, 当 GFR 改变时可产生各种各样尿钙/血浆钙的梯度。例如 GFR 降低时, 尿钙排泄减少, 尿钙/血浆钙梯度增大。

2. **最大重吸收钙/肾小球滤过率 (Tmca/GFR)** 人类 Tmca 在滤过负荷不饱和时也可完成。如果 Tmca/GFR 的比值增高, 则重吸收的曲线上升。甲状旁腺功能亢进的高钙血症有两种类型: ①肾小管重

吸收钙和骨钙吸收增加而引起的高钙血症, 表现为 $Tmca/GFR$ 比值增加; ②肾小管重吸收正常, 高钙血症是由于钙流增加所致, 表现为钙流/ GFR 比值增大。甲状旁腺功能减退的病人比正常血浆钙水平的人有较多的尿钙排出, 导致低钙血症, 表现为 $Tmca/GFR$ 比值降低。

3. 钙流/ GFR 钙流是指钙吸收后在血液循环中流动的钙量, 通常以每分钟经肾小球滤过的量或每升滤液中所含钙量作为钙流大小的指标。肾小管重吸收功能正常时, 钙流与 GFR 将足以维持正常的血浆钙, 但在某些情况下也可产生显著的高钙血症。正常钙流为 0.3 mg/dl GF , 肾小管重吸收减少, 钙流降低, 血浆钙也降低。骨软化就是一个典型的低钙流、低钙血症的例子。 GFR 降低时尿钙排泄减少, 因此, 在肾衰竭时常见有正常的血浆钙。高钙血症时尿钙排泄增加, 即钙流值 $>0.3\text{ mg/dl GF}$, 假如 $Tmca/GFR$ 比值正常, 则高钙血症与钙流增加和 GFR 降低有关。为了维持正常血浆钙, 需要从食物钙中获得足够的钙, 正常人从肠道吸收钙约 $200\sim300\text{ mg/d}$, 为保持血浆钙的体内平衡实际上超过此数值。进食后平均 6 h 完成钙的吸收, 吸收后的钙约在 $8\sim12\text{ h}$ 后才被清除。钙摄取或吸收不良时钙流减少, 为了维持血浆钙的平衡, 通常从骨吸收钙, 骨是维持血浆钙的仓库。

在哺乳动物(人类)钙的重吸收全部由肾小管来完成。一般滤过的钙 $50\%\sim60\%$ 在近曲肾小管、 $15\%\sim25\%$ 在髓袢、 $5\%\sim10\%$ 在远曲肾小管、 $2\%\sim5\%$ 在集合管被重吸收。

PTH 调节血浆钙主要是通过肾小管重吸收钙的作用。对人与动物的研究证明, 切除甲状旁腺后有尿钙排泄增加和血浆钙降低, 所以说, 肾小管是 PTH 调节血浆钙的一个重要靶组织。

4. 肾小管转运钙的机制 一般认为 Ca^{2+} 在肾小管的管腔面为被动运输, 而在基底面为主动运输。在管腔刷状缘面的钙以被动运输的形式通过电化学梯度的改变而进入细胞内; 而在基底膜面, 在 Ca^{2+} -ATP 酶的作用下, 通过主动运输的转运方式将 Ca^{2+} 向周围间质释放。此时 Na^{+} - Ca^{2+} 交换摄入 3 个 Na^{+} 和释出 1 个 Ca^{2+} , 是一种逆向运输 (antiport)。刷状缘膜 Ca^{2+} 的被动运输比基底膜 Ca^{2+} 的主动运输小 3 倍, 但刷状缘膜有很大的钙亲和力, 可结合约 $3\sim4\text{ nmol/mg}$ 蛋白的钙。基底面在 Ca^{2+} -ATP 酶的作用下, 连续有 ATP 酶分解和钙的外流。 PTH 可促进近曲小管细胞 Ca^{2+} 的内流和外流, 提示 PTH 可能参与该细胞对 Ca^{2+} 转运的调节。

(二) 骨的作用

1. 骨的化学组成 骨组织含有无机盐、有机质和水。其中无机盐占 45% 、水占 20% 、有机质占 35% 。骨无机盐不仅能增强骨的机械力, 同时具有维持机体所有组织的化学平衡作用。骨无机盐又分为结晶体和非结晶体两种: ①结晶体主要为磷灰石结晶。从胃肠吸收的钙和磷, 进入血液循环, 而后到达骨形成磷灰石结晶。大量的磷灰石结晶, 为骨组织与细胞外液 Ca^{2+} 交换提供了广大的交换面积, 同时也为骨本身无数的骨小梁和哈弗骨板提供了极大的物质交换面积。为了保持骨钙的动力平衡, 骨吸收和骨形成的钙量保持平衡 ($4\text{ mg/kg}\cdot\text{d}$), 每日更换的钙量为 500 mg 。②无机盐的非结晶体主要为枸橼酸盐, 还包括一些金属离子。骨中的枸橼酸盐占全身枸橼酸含量的 70% , 它主要在磷灰石结晶的表面与 Ca^{2+} 结合在一起, 对碳水化合物、脂肪、蛋白质的代谢和氧化起重要作用。

近年研究表明, 全身有 99% 的钙、 80% 的磷、 50% 的镁、 35% 的钠及 9% 的水存在于骨盐中, 这些物质是组成不同骨组织细胞和骨细胞间基质的重要物质成分。

2. 骨钙代谢及其影响因素 骨钙代谢通过骨形成和骨吸收两个生化过程, 形成离子交换, 使钙的释放和吸收相等, 保持骨钙的动力平衡。一般认为骨代谢首先通过破骨细胞进行骨吸收, 之后通过成骨细胞形成骨, 这种过程在骨中以 3 个月为一周期反复进行, 骨被不断地被破坏和形成。

(1) 骨形成 生骨细胞也称骨祖细胞或前成骨细胞, 其在骨形成上具有重要作用。它首先合成骨胶原、糖蛋白和磷脂等有机质, 除了作为完整的环境因子外, 同时促进骨钙化。生骨细胞有不定型的磷酸氢钙形成, 在生骨细胞的基质囊胞形成磷灰石。由于羟磷灰石呈过饱和状态, 在骨液中与固体相进行离子交换形成水合壳。水合壳从溶液状经混悬状成为不溶性化合物, 最后形成小固体相核心, 以核为中心, 磷灰石结晶形成, 使骨盐成长、增大。固体相形成后, 骨形成有两种方式: ①通过细胞的生物化学

骨形成方式,其时间仅需 15 min;②通过细胞的物理化学骨形成方式,约需 40 h。此外与骨形成有关的另一重要因子是骨有机质,90%的骨有机质形成胶原。

许多激素影响骨的形成。雌激素和雄激素均有促进软骨内成骨的成熟作用,PTH、维生素 D 及其代谢产物 [1, 25 (OH)₂D₃ 和 24, 25 (OH)₂D₃ 等],也参与骨形成和调节骨生长及骨重建的正常过程。任何破骨过程所释放出的钙盐,将会就地再沉着,完成新骨形成。

(2) 骨吸收 骨吸收也具物理化学方式和生物化学方式两种,前者机制尚不清楚。生物化学方式骨吸收主要是通过破骨细胞的作用,破骨细胞来自前破骨细胞和单核细胞。当骨内血流低下,骨内压升高时,在酸性环境中生骨细胞活性降低,破骨细胞活性增高,同时单核细胞向破骨细胞转变增加。破骨细胞先使有机质分解,再使无机盐溶解,枸橼酸盐和蛋白溶解酶把胶原纤维和磷灰石破坏。骨细胞在骨吸收上也有重要作用,它可间接促进骨细胞间隙的骨溶解,引起破骨细胞增生、钙转移、胶原溶解、溶酶体酶增加和氨基己糖合成增加等。骨吸收受很多因素的影响:首先是 PTH,研究认为 PTH 对骨的作用分两个时期:第一期为 PTH 作用后 15~30 min,钙从骨释放,此时不受维生素 D 和巴龙霉素(puromycin)的抑制,第二期为 PTH 作用数小时后引起迟发型钙释放,可被放线菌素 D 和巴龙霉素抑制。近期有人指出,PTH 增强骨吸收作用与 cAMP 增高有关;PTH 促进骨吸收作用需维生素 D 的存在。低钙血症刺激 PTH 的分泌,引起骨钙动员,促进骨吸收;高钙血症刺激甲状腺 C 细胞分泌降钙素(CT),阻止钙动员,抑制骨吸收。目前认为,在 1, 25 (OH)₂D₃ 作用下,骨髓细胞可分化成巨噬细胞并进一步分化成破骨细胞,此细胞中的钙释放到细胞间液后被转运;PTH 使细胞内钙转运增加并把它释放入血中,同时 PTH 激活破骨细胞,促进少数无活性的前破骨细胞转变为有活性的破骨细胞,产生骨吸收作用。此外,甲状腺素、前列腺素、某些生长因子、免疫因子、细胞因子等,如破骨细胞增殖促进因子、单核细胞因子、肿瘤坏死因子、淋巴毒素、补体、缓激肽等均有促进骨吸收作用,而大剂量的雄性激素和雌性激素、胰高血糖素等有抑制骨吸收的作用。

(3) 机体通过骨吸收作用维持血浆钙的平衡 Peacock 等(1977 年)给猪注射乙二胺四乙酸钠(EDTA-Na)发现血浆总钙量增加,指出用 EDTA-Na 引起细胞外 Ca²⁺降低时,几乎不通过 PTH 而是直接使骨释放钙盐,表明骨可直接参与血浆钙的平衡。也有人证明,于低血浆钙水平无 PTH 作用的情况下,骨可提供钙以维持血浆钙在正常的低水平。但总的研究认为,仍然是通过 PTH、维生素 D 及其代谢产物促进骨吸收,通过 CT 抑制骨吸收等复杂因素共同调节血浆钙的平衡。

三、细胞钙及其转运

细胞钙通常以结合态和离子态(Ca²⁺)两种形式存在,Ca²⁺对调节人体细胞的许多生理生化过程起着至关重要的作用。

(一) 细胞内钙的分布和相对的恒定

胞内钙的分布极不均匀,细胞内总钙浓度约为 1 mmol/L,50%存在于细胞核;线粒体占 30%,浓度为 0.6 mmol/L;内质网占 14%,约 0.28 mmol/L;质膜(外层)占 5%,约 0.1 mmol/L;而细胞溶质中仅占总钙的 0.5% (结合态)或 0.005% (离子态)。细胞在静止(非激活)状态时,细胞溶质 Ca²⁺浓度约为 10⁻⁷~10⁻⁸ mol/L,其代表性取值约为 0.1 μmol/L。细胞溶质中 Ca²⁺浓度如果太高,可使磷酸根沉淀,而磷酸根是细胞能量和物质代谢所必需的,故 Ca²⁺过高对细胞有害,甚至会致人体死亡。因此认为细胞内 Ca²⁺稳态失控是许多外界因素引起细胞坏死的共同机制,所以细胞溶质 Ca²⁺处于极为严格的调节控制之中。细胞溶质本身对 Ca²⁺的缓冲能力提供初步调节,细胞溶质内的许多蛋白质、核苷酸、酸性磷脂都可以与 Ca²⁺结合形成缓冲能力。所谓“钙库”的细胞器如内质网、线粒体等,其钙浓度较高,有人认为线粒体内 Ca²⁺大致与细胞溶质相当,而内质网 Ca²⁺用荧光指示剂测定结果约为 0.5 μmol/L,比细胞溶质 Ca²⁺高数倍。它们之所以起钙库作用,主要是与细胞溶质中 Ca²⁺处于不断交换之中,其本身又具有对 Ca²⁺很大的缓冲能力。在线粒体内,形成钙的磷酸盐可能起主要的缓冲作用。在肌浆网发现一种集钙蛋白

(calsequestrin)的组分也具有这种缓冲能力。钙库为细胞溶质 Ca^{2+} 稳态提供了最重要的调节场所。细胞间钙的扩散作用,取决于钙转运能力和细胞膜、线粒体膜及微粒体膜三者的钙泵系统的功能。人体各组织细胞内的钙含量不尽相同,且各种动物也有差异。在生理情况下,体内各组织细胞内的钙含量保持相对的稳定。

(二) 细胞膜及细胞内钙泵的转运体系

Ca^{2+} 通过细胞膜需要一定的电化学梯度,在转运过程中钙泵消耗能量。如果哺乳动物的细胞外液钙浓度接近 10^{-2} mol/L ,细胞内离子钙为 $10^{-5} \sim 10^{-8} \text{ mol/L}$,则细胞外液钙/细胞内钙为 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ 。当膜电位为 -60 mV 时细胞外钙相当于 10^{-2} mol/L ,若电化学梯度在 $120 \sim 210 \text{ mV}$ 时,通过扩散机制和泵作用过程,钙可直接通过细胞膜进入细胞内。

Ca^{2+} 进入细胞内有4条路径:①由于电位差使 Ca^{2+} 自外向内流入;②中介于 Ca^{2+} 受体进入细胞内;③通过细胞膜进入细胞(漏流);④细胞内 Na^{+} 与细胞外 Ca^{2+} 交换的路径(反式钠-钙交换)。而作为细胞内 Ca^{2+} 流出径路主要靠细胞质膜、内质网和线粒体膜等钙转运系统。

1. 质膜的 Ca^{2+} 转运系统 为了维持细胞内的低 Ca^{2+} 浓度,质膜上有2个 Ca^{2+} 转运系统将 Ca^{2+} 排至胞外,即高亲和力、低容量的 Ca^{2+} 泵(Ca^{2+} -ATP 酶)与低亲和力、高容量的 Na^{+} - Ca^{2+} 交换器。

(1) Ca^{2+} 泵(Ca^{2+} -ATP 酶) 这是一种疏水的膜结合蛋白质,分子量约为13.8万的单链,它分解1个ATP分子可将1~2个 Ca^{2+} 跨膜转移到胞外,同时以1:2比例将 H^{+} 转运到胞内,使离子交换结果为电中性,所以质膜两侧膜电位差就不会影响 Ca^{2+} 的转运。由于此酶转运 Ca^{2+} 、水解ATP时都需要 Mg^{2+} 存在,故又称 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶。 Ca^{2+} 泵在转运时与 Ca^{2+} 亲和力很高,很多细胞中都存在质膜 Ca^{2+} 泵,红细胞中提纯的 Ca^{2+} -ATP 酶也已重组入大豆脂质体,重组的脂质体 Ca^{2+} 泵能够积累 Ca^{2+} 与水解ATP,其比值为1,转运最大速率为 $1.5 \mu\text{mol/L} \cdot \text{mg 蛋白质/min}$ 。质膜 Ca^{2+} 泵活性受以下多种因素调控:①钙调素激活:胞内 Ca^{2+} 浓度增加时,与钙调素(CaM)结合并使其活化,活化的CaM可进一步与 Ca^{2+} 泵蛋白结合,使后者活化成为一种反馈性调节机制,将 Ca^{2+} 排出细胞;②钙泵可为酸性膜脂——二磷酸肌醇磷脂(PIP_2)所激活:当细胞受到某些激素刺激时,使 PIP_2 水解。首先 PIP_2 减少使 Ca^{2+} 泵活性降低, Ca^{2+} 排出量减少;其次 PIP_2 水解产物三磷酸肌醇(IP_3)将胞内钙库内质网中的 Ca^{2+} 释放出来,使细胞溶质 Ca^{2+} 增加。这种双重效应具有记忆效应,对神经细胞非常重要;③钙泵有限水解活化:胰蛋白酶将 Ca^{2+} 泵蛋白切去一个20~50 kD 肽段后,不但不影响其活性,反而使其活性增加,可能是切去1个抑制肽后,使活性中心暴露出来之故;④蛋白激酶C(PKC)和依赖cAMP的激酶(PKA)均可使钙泵磷酸化,构象改变而活化。 Ca^{2+} 泵调节机制比较复杂,与多个胞内信使系统有关,说明它在细胞生命活动中很重要。

(2) Na^{+} - Ca^{2+} 交换器 它存在于多种细胞(如神经细胞、肌细胞和肾细胞等)。发现这种交换器最初的证据之一是胞外 Na^{+} 浓度会影响 Ca^{2+} 的移出。这种转移 Ca^{2+} 系统与 Ca^{2+} 泵不同,不能直接利用ATP为能源,它的驱动力有两种:①利用胞内外 Na^{+} 的浓度梯度,此梯度大约为10:1,因而将 Ca^{2+} 移出胞外的能力微弱。由于胞内外 Na^{+} 浓度差是 Na^{+} - K^{+} 泵维持的,故可认为 Na^{+} - Ca^{2+} 交换器在间接地利用ATP为能源;②动力学研究发现 Na^{+} - Ca^{2+} 交换器排出一个 Ca^{2+} ,交换进入3个 Na^{+} ,这种净进入1个正电荷的效应,使交换器增加了另一个能量来源——膜电位,因此细胞质膜两边内负外正的电压梯度可以驱动交换器。总之, Na^{+} - Ca^{2+} 交换器是靠化学梯度和电位梯度二者结合驱动的。 Na^{+} - Ca^{2+} 交换器与 Ca^{2+} 泵的另一区别是亲和力低而交换容量大,一般认为交换器是在胞内 Ca^{2+} 浓度为 $1 \sim 5 \mu\text{mol/L}$ 时(比静止时约大10倍)才能达到最大交换量的一半,而其交换量大,如在1个心肌细胞内,每秒钟能将 3×10^9 个 Ca^{2+} 排出胞外。所以 Na^{+} - Ca^{2+} 交换器主要用于在兴奋性细胞受到刺激后从胞内除去大量的 Ca^{2+} 。

上面已谈到 Ca^{2+} 从胞外进入胞内通过质膜有4种途径。目前认为 Ca^{2+} 通道是一种膜结合蛋白,它通过构象变化呈开放或关闭状态,从而控制 Ca^{2+} 流动,但对其分子结构大多尚不完全清楚,因此仅根据控制启闭的因素对电压门控 Ca^{2+} 通道和激动剂、受体门控 Ca^{2+} 通道作较深入的介绍:①电压门控钙通道(voltage-gated Ca^{2+} channel)受控于膜电压的变化。当细胞静止时,即膜电位为胞内 -90 mV 左右时, Ca^{2+}

通道处于关闭态；当细胞受到刺激引起初始去极化作用时，首先是膜上对电位敏感的 Na^+ 通道开放， Na^+ 进入细胞使胞内进一步去极化；当去极化到 -30 mV 左右时， Ca^{2+} 通道开放；而膜电位进一步改变达到 $+40\text{ mV}$ 时，其他离子的作用（如 K^+ 外流）使膜电位又回到 -90 mV ， Ca^{2+} 通道重又关闭。电压门控 Ca^{2+} 通道开放时间约为 $1\text{ }\mu\text{s}$ ，允许大约 $3\,000$ 个 Ca^{2+} 通过。它们又分为 3 种：一种为低阈值，即在 -60 mV 弱去极化时则可开放，形成的单通道电流值小（ $100\text{ mmol/L Ca}^{2+}$ 条件下电导值约 8 ps ，即 8 皮西门子 ），而且开放时间短呈瞬时状态，称 T 型（transient type），又称快通道（fast channel）；另一种为高阈值（ -10 mV 才激活），形成的电流值大（单通道电导值约 $15\sim 25\text{ ps}$ ），开放时间长，称 L 型（long type），又称慢通道（slow channel）；第三种为 N 型，阈值 0 mV ，持续时间及电流值处于 T 与 L 型之间。三种类型 Ca^{2+} 通道对通道阻断剂的反应不同，如 L 型对二氢吡啶类阻断剂敏感，而 T 型则不敏感。②激动剂-受体门控 Ca^{2+} 通道（receptor gated Ca^{2+} channel）的开启由激动剂如激素、神经递质作用于受体后引起。对它的了解较少，其调节机制可能有两种：一种是近年报道的 IP_4 调控方式。激动剂结合到受体后，由膜内侧磷脂（ PIP_2 ）分解产生的 IP_3 ，再经磷酸化产生 IP_4 ， IP_3 很快引起胞内钙库的 Ca^{2+} 释放，而当存在 IP_3 时， IP_4 继而引起质膜受体门控钙通道的开放。另一种为激动剂，如激素与细胞表面受体结合激活腺苷酸环化酶，产生大量的 cAMP，cAMP 通过激活 PKA 使钙通道磷酸化共价修饰而开放。一般认为激动剂主要是通过 IP_3 使内质网释放 Ca^{2+} ，但在激动剂持续存在的情况下，内质网钙库会耗尽，因此激动剂同时使质膜 Ca^{2+} 通道开放，对补充胞内钙库的 Ca^{2+} （reloading）是很重要的。上述二类 Ca^{2+} 通道无法绝对划分，有些电压门控 Ca^{2+} 通道，如 L 型通道，也受激动剂的调节。

2. 内质网 Ca^{2+} 转运系统 内质网或肌浆网也存在类似质膜上的 Ca^{2+} 泵，它靠水解 ATP 将细胞溶质 Ca^{2+} 逆浓度梯度泵入内质网。肌浆网含有丰富的 Ca^{2+} 泵，常作为 Ca^{2+} 泵研究模型。肌浆网 Ca^{2+} 泵单体分子量约为 $10\sim 11$ 万，不对称地分布于膜内外，其氨基酸序列亦已基本搞清楚。 Ca^{2+} 泵活性需要 Mg^{2+} ，但与 Ca^{2+} 亲和能力最高，如对胰腺腺泡细胞内质网 Ca^{2+} 泵的研究表明其亲和常数为 $0.1\sim 0.2\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。血小板内质网 Ca^{2+} 泵蛋白已被提纯及重组成功，而且测定表明分解 1 个 ATP，可以泵入 2 个 Ca^{2+} 。内质网 Ca^{2+} 泵的活化机制尚未完全清楚，在心肌肌浆网上发现，依赖 CaM 与 cAMP 的蛋白激酶可以活化 Ca^{2+} 泵，但不是直接作用于 Ca^{2+} 泵分子，而是通过与 Ca^{2+} 泵相结合的受体磷酸蛋白（phospholamban），使其磷酸化而使 Ca^{2+} 泵本身变构引起活化。内质网 Ca^{2+} 泵在细胞快速转运 Ca^{2+} 上起主要作用。有人估算，当介质 Ca^{2+} 为 0.1 、 1 与 $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时，内质网转运 Ca^{2+} 分别占总量的 69% 、 90% 与 47% 。被泵入的 Ca^{2+} 以氧化钙或磷酸钙的形式存在，也可被集钙蛋白等 Ca^{2+} 高亲和力蛋白所结合，因而内质网可富集高达 5 mmol/L 的总钙。

内质网释放 Ca^{2+} 已证明是通过 Ca^{2+} 通道。肌浆网 Ca^{2+} 通道蛋白已经提纯，并重组入脂质双层获得成功。研究表明 Ca^{2+} 通道电流值很高，即释放 Ca^{2+} 的能力很强。内质网 Ca^{2+} 通道调节机制至少有两种：①质膜肌醇磷酸分解产物 IP_3 与内质网膜受体结合后引起 Ca^{2+} 通道开放；②肌浆网与 T 小管（质膜在肌细胞中的内陷管状结构）存在紧密联系，在兴奋-收缩耦联过程中，T 小管去极化直接引起肌浆网 Ca^{2+} 通道开放，这种 Ca^{2+} 通道因对植物碱 ryanodine 敏感，故称 ryanodine 受体（RYR）钙通道。

3. 线粒体 Ca^{2+} 转运系统 线粒体产生 95% 以上的细胞能量， Ca^{2+} 作为普遍存在的细胞内第二信使，两者在细胞生命活动中均具有重要意义。自 20 世纪 70 年代以来，学者们对线粒体钙转运及 Ca^{2+} 在线粒体中的作用进行了广泛而深入的研究。近年来，线粒体钙超载及其在细胞损伤中的作用更是研究的热点，但其中错综复杂的机制仍有待进一步探讨。

线粒体摄入 Ca^{2+} 是靠膜上的转运体，它也是一种存在于膜上的蛋白质，其能量是来自线粒体呼吸代谢形成的膜电位，它在线粒体内膜高达 -180 mV 。这种膜内的负电位，使带正电荷的 Ca^{2+} 顺电位梯度向内移动，而且一般认为该转运体并不同时交换其他离子。当细胞溶质中 Ca^{2+} 达到 $25\text{ }\mu\text{mol/L}$ ，转运体吸入 Ca^{2+} 才达到最大值的一半，因此它对转运体亲和力很低。但由于线粒体运送膜面积很大（常达到整个细胞的 90% 左右），在细胞溶质 Ca^{2+} 浓度高时它的运送量很大，甚至超过内质网。有些资料估算，当介质

Ca^{2+} 浓度为 0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$ 时, 线粒体运送 Ca^{2+} 量分别为 0、6.4%、51%。线粒体内膜上同时存在 HPO_4^{2-} 的转运体, 其转运能力与 Ca^{2+} 相当。在线粒体基质处于碱性条件下, Ca^{2+} 与 HPO_4^{2-} 形成 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 沉淀, 这样一来, 线粒体就可以不断吸入 Ca^{2+} , 积蓄大量的钙而又不致造成内部 Ca^{2+} 积累到有害的程度。而当线粒体内 Ca^{2+} 排出后, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 又可部分溶出 Ca^{2+} 及 HPO_4^{2-} , 线粒体对 Ca^{2+} 缓冲能力也是有限的, 当质膜受损, 胞外过多 Ca^{2+} 进入线粒体时, 会伤害线粒体。线粒体吸收大量 Ca^{2+} 后, 能以不影响细胞代谢的速度释放 Ca^{2+} , 这种释放是通过转运体来进行的, 就像质膜交换器以 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换形式进行, 而与质膜交换器不同的是它以 2 个 Na^+ 交换 1 个 Ca^{2+} , 即电中性交换, 这使得线粒体内膜电位很高时, 也不影响交换, Ca^{2+} 始终可以缓慢释放。研究发现线粒体内 Ca^{2+} 浓度在细胞静止状态下大致相当于细胞溶质 (但总钙浓度可以很高)。线粒体内膜两侧都处在低 Ca^{2+} 条件下, 亦不断地靠单一转运体与 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 交换器交换 Ca^{2+} , 这需消耗一定的能量, 似乎是一种无益循环, 但这种无休止的循环可以保证线粒体为保护细胞不受 Ca^{2+} 伤害。当细胞溶质 Ca^{2+} 太多, 线粒体吸入 Ca^{2+} 达到 1 $\mu\text{mol/L}$ 以上时, 可影响几种呼吸酶的活性, 从而使呼吸速率增加, 产生较多的 ATP, 这作为一种反馈机制又为 Ca^{2+} 移出细胞和进入细胞内 Ca^{2+} 库提供更多的能量。

近年来的研究已对线粒体的钙转运及其在细胞代谢中的作用有了较全面的认识和进展, 现在认为线粒体具有一套完整的 Ca^{2+} 转运系统, 包括两条摄取途径和三条释放途径。生理条件下, 它们在细胞胞质与线粒体钙稳态维持以及细胞能量代谢中起重要作用, 线粒体从胞质摄取的 Ca^{2+} 可激活某些 Ca^{2+} 敏感的呼吸酶和代谢过程。病理条件下, 线粒体 Ca^{2+} 转运发生紊乱, 通过线粒体通透性转换导致细胞坏死或凋亡。

(1) 线粒体 Ca^{2+} 转运途径及其特点 线粒体 Ca^{2+} 转运机制十分复杂, 有两条摄取途径: Ca^{2+} 单向转运体 (uniporter) 和快速摄取模式 (rapid uptake mode, RaM); 三条释放途径: Na^+ 依赖性释放途径; Na^+ 不依赖性释放途径; 线粒体通透性转换孔 (permeability transition pore, PTP)。

① Ca^{2+} 摄取 Ca^{2+} 单向转运体是 70 年代初发现的转运胞质 Ca^{2+} 进入线粒体的途径。线粒体通过这条途径摄取 Ca^{2+} 时, Ca^{2+} 首先和线粒体外膜上的转运激活位点结合, 激活转运位点并使之粘合大量 Ca^{2+} , 然后通过单向转运体转运 Ca^{2+} 进入线粒体内。单向转运体还能转运其他一些阳离子进入线粒体, 其转运能力依次为 $\text{Ca}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Fe}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ 。单向转运体转运 Ca^{2+} 还具有以下几个特点: 转运体是顺线粒体电化学梯度进行的弥散过程, 依赖于膜电位; 不与其他离子进行交换或偶联; Sr^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ba^{2+} 等对其具有竞争性抑制作用, 钇红是其非竞争性抑制剂, Mg^{2+} 可减慢其对 Ca^{2+} 的摄取; 除 Ca^{2+} 外, 单向转运体还可被 Pr^{3+} 、ADP、氨基糖甙类抗生素、鱼精蛋白等激活。单向转运体的含量约 0.001 nmol/mg 线粒体蛋白, 一些学者对单向转运体进行了分离提纯和结构分析, 但目前尚未能取得一致的结果。

RaM 是一条新近发现的线粒体 Ca^{2+} 摄取途径, 它使线粒体随胞质 Ca^{2+} 浓度脉冲式的变化而非常快速地摄取 Ca^{2+} , 故被称为快速摄取模式。RaM 对 Ca^{2+} 的转运是通过一种转运复合体进行的, 转运复合体对 Ca^{2+} 的传导性具有周期性变化的特点。静息状态时, 转运复合体对 Ca^{2+} 的传导性较高, 当一个 Ca^{2+} 脉冲所致线粒体外 Ca^{2+} 浓度升高时, 转运复合体摄取 Ca^{2+} , 同时传导性立即降低, 当脉冲结束, 线粒体外 Ca^{2+} 浓度下降时, 其传导性又重新升高, 准备下一个脉冲摄取 Ca^{2+} 。RaM 摄取 Ca^{2+} 与线粒体内已经含有的 Ca^{2+} 浓度大小无关, 它不是通过离子交换实现的, 是一种净摄取。 Mg^{2+} 对 RaM 无明显作用, 精胺对 RaM 呈双相作用。RaM 转运复合体的激活和单向转运体相同, 都与线粒体外膜激活位点对 Ca^{2+} 的粘合有关, 肝线粒体 RaM 转运复合体激活的 Ca^{2+} 浓度 Kd 值为 100~200 nmol/L。体外试验表明, 当 Ca^{2+} 浓度恒定时, RaM 与单向转运体的 Ca^{2+} 摄取曲线类似, 但目前尚不明确介导 RaM 的转运复合体是单向转运体的另一种作用方式, 还是另外的转运复合体。RaM 已从心、脑、肝等组织细胞线粒体的体外实验中得到证实, 但心、肝两组织中 RaM 的作用方式和功能可能有所不同。许多学者在细胞水平亦已证明 RaM 的存在, 并认为它在细胞生命活动中可能具有调节或放大胞质钙信号的作用。

② Ca^{2+} 释放 Na^+ 依赖性 Ca^{2+} 释放是指线粒体内的 Ca^{2+} 与胞质的 Na^+ 以 $\text{Ca}^{2+}/n\text{Na}^+$ ($n \geq 2$) 的方式进行

交换, Ca^{2+} 外流进入胞质, Na^+ 则进入线粒体内。在肝线粒体, 它的最大释放速率约为 $1.2 \pm 0.1 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 是 Ca^{2+} 最大摄取速率的 $1/1\,000$, 可被氰化物、高浓度钌红及低水平的脱偶联剂所阻断。 Na^+ 不依赖性 Ca^{2+} 释放的实质是一种 $\text{Ca}^{2+}/n\text{H}^+$ ($n \geq 2$) 交换转运, 它在心、肝的最大速率分别约 $18 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $2.6 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, 可被维拉帕米、Trifluoperazine、 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 所抑制。所有组织均具有 Na^+ 依赖性与 Na^+ 不依赖性 Ca^{2+} 释放两条途径, 但存在一定的组织差异性, 心肌组织以前者为主, 而肝脏则以后者为主。这两条 Ca^{2+} 释放途径均需消耗能量, 曾经一度认为 Na^+ 、 H^+ 的电化学梯度是其唯一能量来源, 但目前研究表明这一过程还必须由 ATP、GTP 水解供能, 很可能是一个主动转运过程。但因为缺乏生理及病理条件下细胞水平的研究, 线粒体通过这两条途径的 Ca^{2+} 释放是单一的主动或被动过程还是两者兼而有之, 以及它们在生理及病理条件下有无差异, 目前尚不清楚。

线粒体通透性转换孔是 Hunter 与 Haworth (1980) 在对线粒体进行体外研究时发现的一种 Ca^{2+} 释放途径, 它的实质是一种通道复合体, 由腺苷转位酶 (adenine nucleotide translocase, ANT) 和线粒体基质中的亲和素 D (cyclophilin D, CyP-D) 构成。Ichas 等 (1997) 研究表明 PTP 具有关闭、亚通透和高通透三种状态。关闭是其“不作为”时的自然状态。当线粒体 Ca^{2+} 浓度与 pH 均升高时 PTP 转为亚通透状态, 即进行所谓的 Ca^{2+} 诱导性 Ca^{2+} 释放 (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR)。其具体过程包括: 线粒体接受胞质 Ca^{2+} 信号的刺激, 在其自身膜电位驱动下, Ca^{2+} 进入线粒体; 线粒体有氧呼吸加强, 基质 pH 升高; pH 升高导致 PTP 开放, 后者使线粒体质子梯度与膜电位暂时消失, Ca^{2+} 外流, 同时基质酸化; 基质 pH 降低使 PTP 关闭; 呼吸链重建线粒体质子梯度, 恢复膜电位, 驱动线粒体再摄取 Ca^{2+} 。这是一个周期性进行的过程, 受线粒体基质 pH 的直接调控。除此之外, 它还具有以下特点: 亚通透状态下, 线粒体只允许分子量小于 300 Da 的物质自由进出; 不导致线粒体肿胀; 受胞质或线粒体悬浮介质中 Ca^{2+} 脉冲速率的间接调控而与 Ca^{2+} 浓度无关。有实验表明, 当以同样 Ca^{2+} 浓度在较慢的速度下作用于线粒体时, 它不发生 Ca^{2+} 诱导性 Ca^{2+} 释放, 而只是摄取 Ca^{2+} 。

线粒体通透性转换孔的高通透状态即所谓的线粒体通透性转换 (mitochondrial permeability transition, MPT) 与细胞死亡调节有关。当发生 MPT 时, 线粒体允许分子量小于 5 000 Da 的物质自由进出, Ca^{2+} 全部释放, 膜电位完全、永久消失, 线粒体肿胀, 它受 Ca^{2+} 、ADP、氧化应激及高 pH 诱导, 而环孢素 A (Cyclosporin A, CsA)、PLA2 抑制剂、低 pH 可抑制 MPT 发生。关于其发生的机制, 目前认为主要是 CyP-D 与 ANT 结合后, ANT 发生构象改变所致, 但具体机制尚有待于进一步的研究。

(2) 线粒体 Ca^{2+} 转运在细胞代谢中的作用 ① 底物-产物反馈调节理论 经典理论认为细胞通过底物-产物的反馈 (substrate-product feedback) 调节其能量代谢。当细胞耗能水解 ATP 时, 产生 ADP、 P_i 增多, 同时 ADP/ATP 比值升高, 它们刺激氧化磷酸化的某些位点, 如 ATPase、ANT 及磷酸肌酸旁路, 加速 ATP 的合成; 而 ATP 合成增多又可反作用于这些位点, 下调呼吸酶活性, 从而保持细胞能量代谢平衡。这一理论的基础是细胞能量的热力学模型, 但 ATP、ADP 跨线粒体膜转运及质子梯度的存在, 使得其显然不符合热力学平衡理论。而到目前为止, 热力学非平衡理论尚不能完全解释底物-产物反馈调节的具体过程, 更未能找出一个明确而特异的调控 ATP 生成的物质, 似乎是一个不可知的“黑箱”理论。事实上, 随着磁共振等新技术的运用, 已有学者发现心、肝、肾等组织细胞线粒体氧化磷酸化速率与胞质 [ADP]、 $[\text{P}_i]$ 及 [ATP] 并无明显关联, 这说明可能还有其他更重要的机制参与细胞代谢的调节。

② 线粒体 Ca^{2+} 及其转运在细胞代谢中的调节作用 细胞能量代谢调节, 实质上是细胞受到外界刺激后产生一定的信号, 经由某些信使途径传到线粒体和耗能机构, 并使其作出与之相适应的反应, 以维持细胞能量产生与利用过程的平衡。 Ca^{2+} 是细胞内普遍存在的第二信使, 一方面它介导细胞许多生命活动, 如细胞收缩、分泌、运动等, 一定程度上可以认为它调控细胞对能量的利用; 另一方面, 细胞的主要产能机构——线粒体具有十分完善的 Ca^{2+} 摄取和释放系统, 可以敏感而快速地感受细胞质内 Ca^{2+} 所代表的信息变化, 从而使其具有调节线粒体呼吸的可能。Hajnóczky 等 (1995) 研究表明, 当肝线粒体摄取 Ca^{2+} 后, 胞质 NADH、 FADH_2 生成明显增多, 可能是 Ca^{2+} 激活丙酮酸脱氢酶、异枸橼酸脱氢酶、 α -酮戊二酸

脱氢酶所致。另有研究报道, Ca^{2+} 还可通过调节 H^+ -ATPase、ANT 活性影响线粒体氧化磷酸化。Scheur 及 Trolling 等 (1997) 采用不同方法对心肌细胞 Ca^{2+} 转运进行研究, 结果表明线粒体可随细胞收缩频率变化从胞质摄取相当数量的 Ca^{2+} , 这一现象已在内皮细胞、肝细胞、卵巢细胞及平滑肌细胞得到证实。Jouaville 等 (1995) 的研究还指出, 线粒体既可快速摄取 Ca^{2+} , 还可快速释放 Ca^{2+} , 后者与 PTP 有关。线粒体可能通过 RaM 快速摄取胞质 Ca^{2+} 感受细胞信息, Ca^{2+} 进入线粒体后调节某些呼吸酶的活性和 Ca^{2+} 敏感的代谢过程, 然后再通过 CICR 快速释放 Ca^{2+} , 始终维持对每一个细胞信号的敏感性, 使细胞保持生理条件下能量生成与利用的平衡。可见, Ca^{2+} 是细胞能量代谢的重要调节介质。

③对细胞活力的调节 线粒体 Ca^{2+} 及其转运不但在细胞能量代谢调节中起重要作用, 同时还对细胞的活力——生存与死亡进行调节。曾经一度认为细胞胞质钙浓度增高是缺血再灌注及许多化学物质所致细胞损伤的主要原因, 但最新研究表明细胞死亡的根本原因是线粒体钙超载。线粒体在调节细胞钙稳态中起重要作用, 任何原因所致的胞质钙浓度升高都可能首先导致线粒体积聚超量的钙, 并最终使线粒体 PTP 呈高通透状态且广泛持久开放, 线粒体肿胀破坏, 细胞能量耗竭。同时线粒体 Ca^{2+} 大量释放, 胞质 Ca^{2+} 升高超过其所能承受的限度时, 可导致多种蛋白水解酶、磷脂酶激活, 使细胞膜崩解, 细胞坏死。另一方面, 线粒体 Ca^{2+} 升高时, 如果只是 PTP 的短暂开放, 且线粒体能够维持细胞能量供应, 细胞不会立即坏死, 但线粒体可释放出细胞色素 C 与凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor, AIF), 两者均可导致细胞凋亡。

总之, Ca^{2+} 及其转运一方面通过调节细胞的能量代谢维持生理条件下细胞的生命活动; 另一方面, 病理条件下线粒体 Ca^{2+} 升高及其转运紊乱又可使其发生 MPT 并最终导致细胞死亡。目前这两方面的研究均方兴未艾, 但其中许多具体的细节和机制尚不完全清楚, 有待于进一步的研究和探索。综上所述, 以上三个系统都是从细胞质转运钙, 因此细胞质是真正调控 Ca^{2+} 的场所。

四、钙与细胞代谢反应调节

神经、内分泌系统的兴奋, 细胞内外环境的变化, 均可使细胞代谢产生相应的反应, 此时细胞内外 Ca^{2+} 发生移动。钙在细胞代谢反应中起第二信使的作用。 Ca^{2+} 作为细胞信使的基础, 首先是在细胞质与胞内钙库 (某些细胞器) 或胞外 Ca^{2+} 之间存在浓度梯度, 这种梯度是靠膜上 Ca^{2+} 转移系统维持的; 其次是 Ca^{2+} 本身的特性更能适应于它和靶蛋白形成特异性紧密的结合, 如 Ca^{2+} 与胞内受体蛋白的结合, 这是作为传递信息的胞内信使的基本条件之一。

在激素特别是多肽激素 (如 PTH、CT、下丘脑激素、胃肠道激素和垂体激素等) 作用下, 可使靶器官细胞的某激素受体与其激素结合并导致受体构象改变, 使 G 蛋白结合位点暴露, G 蛋白起信号放大作用并提供一个重要的调节步骤。G 蛋白与 GTP 结合态开通了信号转换通路, G 蛋白水解 GTP 而与 GDP 结合则关闭信号转换通路。就腺苷酸环化酶 (AC) 系统而言, 胞外的刺激信号与抑制信号分别被刺激性或抑制性受体 (R_s 和 R_i) 所接受, 通过刺激性或抑制性 G 蛋白 (G_s 和 G_i) 传递给 1 个共同的腺苷酸环化酶, 使其激活或钝化; 当 AC 被激活时, 细胞溶质部分产生 cAMP 信号, 通过 PKA 使蛋白质磷酸化进而调节细胞反应, cAMP 信号可被 PDE 分解灭活, 终止信号。很多研究表明, Ca^{2+} 可通过 CaM (钙调素) 活化 AC 及 PDE 调节 cAMP 水平, 也发现 Ca^{2+} ·CaM 可使 PDE 磷酸化或脱磷酸化从而调节 PDE 活性。因此, Ca^{2+} 信号可通过 cAMP 信号途径调节细胞反应。有研究证明 AC 在发挥作用时, 除需要 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 参与外, 尚需微量的 Ca^{2+} 存在。钙的内移可促进 cAMP 的分解反应, 但钙的移动又受 cAMP 的调节。

肌醇磷脂信使系统是继环核苷酸信使系统之后发现的又一重要信使系统。激动剂激活受体后, 依赖 Ca^{2+} 的磷脂酶 C (PLC) 与 G 蛋白相互作用, 使膜上的磷脂酰肌醇—4, 5-二磷酸 (PIP_2) 水解, 产生两个第二信使: 肌醇 1, 4, 5-三磷酸 (IP_3) 和 1, 2-二酯酰甘油 (DAG)。它们分别激动两个信号传递途径, 即 $\text{IP}_3/\text{Ca}^{2+}$ 和 DAG/PKC 途径, 故又称“双信使系统”。

IP_3 通过作用于内质网膜上特异性受体, 使其内部 Ca^{2+} 释放, 引起胞内 Ca^{2+} 水平升高, 从而启动胞内

Ca^{2+} 信号系统,通过依赖 $\text{Ca}^{2+}\cdot\text{CaM}$ 等酶类的活性变化来调控一系列的生理过程。DAG 则通过激活蛋白激酶 C (PKC),以磷酸化的形式对许多蛋白质和酶类进行修饰,从而调控另外一系列的生理过程。两条途径相辅相成,互相制约,同时两条通路信号的强弱又可根据原始信号的不同特征在细胞内加以调节,使细胞对外界信号做出不同的反应。

早已证明钙与离子通道有关,钙动员引起的胞内 Ca^{2+} 浓度增加也可直接参与离子通道的调节。Meech (1974 年)最先发现细胞内 Ca^{2+} 浓度增加可以活化 K^{+} 通道,以后人们又发现 Ca^{2+} 可调节 Cl^{-} 和 Na^{+} 通道的开启,还可活化一类非专一的阳离子通道。 Ca^{2+} 对离子通道的活化对细胞的许多功能,特别是对细胞的兴奋性传导以及内分泌和外分泌等均起着重要的调节作用。

前已述及 Ca^{2+} 又被称为“第二信使”,但 Ca^{2+} 运动如何耦联于生理效应,参与何种生化反应,迄今尚未完全解决。现已发现,当 Ca^{2+} 与 CaM 结合成复合物后,可与一系列与 Ca^{2+} 有依赖关系的蛋白激酶调节亚单位结合,使其呈激活状态,例如蛋白激酶、磷酸化激酶和腺苷酸环化酶等,这些反应都与 $\text{Ca}^{2+}\cdot\text{CaM}$ 复合物有关。目前,已证明有 20 多种靶蛋白(酶)的活性受 CaM 的调节, Ca^{2+} 的信息就是通过 CaM 来影响细胞的多种代谢和功能的。另外, CaM 与 cAMP 及肌醇磷脂等胞内信使系统也有多种联系,这是近年生物科学研究最活跃的领域之一。 $\text{Ca}^{2+}\cdot\text{CaM}$ 系统的异常将会导致高血压、血管痉挛、成年型糖尿病、细胞增殖和凝血异常等病理现象。

此外也有报道,维持细胞内低钙、细胞外高钙浓度需要机体产生大量的能量,胞浆 Ca^{2+} 排出到胞外的主要机制是质膜上的 Ca^{2+} -ATP 酶(钙泵),其活性依赖于 CaM 和 ATP 逆细胞膜内外之间的 Ca^{2+} 浓度梯度将胞内 Ca^{2+} 主动转运到胞外。也有研究表明:cAMP 可促进 Ca^{2+} -ATP 酶的磷酸化,使该酶激活;同时 cAMP 也可激活 Ca^{2+} 通道的活性。因此 cAMP 可促使质膜 Ca^{2+} 内流和外流增加,在不同的情况下起到调节作用。

总之, Ca^{2+} 在细胞功能的调节中起重要作用,如神经传导、肌肉收缩、细胞分泌和增殖、形态发生、细胞老化等许多细胞反应过程都有 Ca^{2+} 的调节作用。而细胞的多种功能都依赖于细胞内外极高的 Ca^{2+} 浓度差存在,一旦这种浓度差减低,细胞就会受到功能性损伤,甚至引起死亡。

第二节 细胞内钙的测定

钙在各类细胞中充当着一种最为普通的第二信使的角色。生命的起点(受精)就是在 Ca^{2+} 的调节下完成的,众多细胞各种功能水平的高低同样依赖于 Ca^{2+} 的调节。早在一百多年前,Ringer 和他的合作者就已经证明灌注含 Ca^{2+} 液(任氏液)是维持离体蛙心正常收缩所必需的。20 世纪 40 年代,有研究发现在肌组织中注入 Ca^{2+} 可促进肌肉收缩,而 K^{+} 、 Na^{+} 甚至 Mg^{2+} 都不能出现上述现象。Heilbrunn 强调这是 Ca^{2+} 在各种细胞功能中的重要任务,然而,他的观点过了很长时间才被广泛接受。20 世纪 60 年代,Ebashi 和 Lipmann 发现了细胞内 Ca^{2+} 储存站,它就是位于肌细胞中的肌浆网。接着他们又明确了肌肉收缩的确切机制以及在高等脊椎动物的横纹肌中 Ca^{2+} 结合蛋白(肌钙蛋白)所起的作用。从此以后,人们便认识到 Ca^{2+} 结合蛋白广泛地存在于各种细胞中,同时还起着连接作为第二信使的 Ca^{2+} 与各种细胞现象的作用,这就有利于分析各种细胞中 Ca^{2+} 的潜在作用。细胞通过一些自身的调节机制,如 Ca^{2+} 通道、 Ca^{2+} 泵以及 Ca^{2+} 交换器,严格地控制其内部 Ca^{2+} 的平衡。

自 20 世纪 20 年代以来,科学家就试图进行细胞内 Ca^{2+} 浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 的测定。第一次可靠的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的测定数据是由 Ringer 和 Ashley 通过在甲壳动物的巨大肌纤维中注射水母荧光蛋白的方法得到的。随后,在 20 世纪 80 年代,Tsien 和他的同事发明了 Ca^{2+} 化学荧光指示剂,这种试剂为测定 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 提供了可靠的方法。随着指示剂的进步,与 Ca^{2+} 相关的细胞现象的研究也得到了突飞猛进的发展。

20 世纪 80 年代,随着激光扫描共聚焦显微镜的出现,细胞内 Ca^{2+} 的测定方法有了显著的进步。激光扫描共聚焦显微镜及更新的多光子显微系统,使得我们除了能够测定 Ca^{2+} 的浓度外,还能在亚细胞水

平上对细胞内 Ca^{2+} 的活动进行精确的时间和空间上的分析。这是由于激光扫描共聚焦显微镜和多光子显微系统测到的荧光被限制到焦点平面上, 这些光学技术使科学家们能够了解 Ca^{2+} 在细胞内的空间运动情况。

鉴于 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 在生物学上的重要性, 以往科学家建立了很多在细胞和 (或) 亚细胞水平对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 活动机制进行分析的方法或技术, 然而没有一种最有效的方法或技术能够满意地检测 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。虽然每种分析 Ca^{2+} 活动的方法都有其优越性, 但同样又都存在不足。

一、化学荧光指示剂

(一) 化学荧光指示剂的选择标准

最常用的 Ca^{2+} 指示剂是化学荧光探针, 因为与其他类型的化学指示剂相比, 荧光探针可产生反映 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 变化相对较大的信号。此类经典的指示剂大部分是由 Tsien 和他的同事制作的。既然有多种不同的 Ca^{2+} 荧光指示剂, 那么对于一个特定的实验, 选择一种最合适的探针是十分重要的。依据不同的标准可以将其进行分类, 常见的一种分类方法是根据其属于双波长或单一波长的指示剂将其分为两类: 前一类包括吲哚 1 (Indo 1)、呋喃 2 (Fura 2), 而后者包括氟化物 3 (Fluo 3)、钙绿类及 Rhod 2 等。特别是当使用单或多光子激光激发时, 其波长应固定在一定范围内, 以使所选指示剂的吸收峰值出现在本系统的激光波长范围内。最近兴起了用复合染料同时分析多个参数 (例如 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和 pH 或 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 和膜电位) 或测量线粒体等目标亚细胞结构中的 Ca^{2+} 含量的做法。因此, Ca^{2+} 指示剂的散射光谱即成为选择复合染色剂的决定因素, 根据散射光谱可将 Ca^{2+} 指示剂分为以下几种: ① 蓝色发光组: 奎宁 2 (Quin 2)、Indo 1、噻嗪甲苯 (benzothiazine)、Fura 2; ② 绿色发光组: 呋喃 2、BTC、Fluo 3、钙绿和俄勒冈绿 Oregon green、1, 2-bis (2-aminophenoxy) ethane-N, N, N', N'-tetraacetic acid (BAPTA); ③ 黄色和橙色发光组: 钙橘黄 (calcium orange)、钙深红 (calcium crimson) 和铈合物 2 (rhod 2); ④ 红色和近红外发光组: 钙红和呋喃红 (Fura red)。

选择指示剂还需要考虑其化学结构。目前可买到的 Ca^{2+} 指示剂常以盐、酯等形式存在, 而指示剂与细胞结合的方法决定于指示剂的化学构成。选择指示剂另一重要的标准是该指示剂与 Ca^{2+} 的结合力, 这一结合力的大小可由电离常数 K_d 来反映。一般认为当 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 位于 $0.1 \times K_d$ 到 $10 \times K_d$ 时, Ca^{2+} 指示剂的吸收和发光光谱或荧光辐射强度将随 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化而变化, 但只有当 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 在非常接近且低于 K_d 值时, Ca^{2+} 敏感性才最可靠。尽管高结合力 (低 K_d) 的 Ca^{2+} 指示剂可发出明亮的荧光, 由于高结合力 Ca^{2+} 指示剂在 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 相对较低时就可饱和, 因此可能导致对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的错误估计, 所估计的要比实际量小。近来低亲和力 Ca^{2+} 指示剂也已研制出来, 其用途之一是测量细胞器内的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平 (细胞器内的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平较高), 如肌质网或内质网组织中的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化是 Ca^{2+} 依赖性生理活动的重要调节因素之一, 由于这些细胞器中的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平一般都很高, 而传统的高结合力 Ca^{2+} 指示剂又存在缓冲效应, 因而不适用于此。近来已有用低结合力 Ca^{2+} 指示剂的报道, 这种指示剂还可以用来测量 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平的迅速变化, 例如其能够立即分析与肌肉收缩伴随的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 迅速改变。

(二) 紫外光激发的荧光指示剂

第一种普遍使用的化学 Ca^{2+} 荧光指示剂是紫外波 (UV-激发) 指示剂, 虽然后来有多种可见光波长的指示剂相继问世, 但 UV-激发指示剂仍被广为使用。UV Ca^{2+} 指示剂的缺点在于其需要 UV 激发, 而紫外放射比长波照射更具有细胞毒性。此外当被电磁波谱中的紫外部分激发时, 除了指示剂外, 一些细胞内部成分也会放出自身的荧光, 这样一来就可能影响对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的准确估计。另外, 紫外激发源的使用还可能造成一些光学问题, 如普通目镜没有配合紫外光而追加配备特殊的光学元件, 虽然这在宽视野的显微镜检测时并不是个严重的问题, 但是由于紫外激发系统需要配备特殊的光学元件, 因而也就抬高了造价并可能降低了总体信号的精确度。

1. Quin 2 Quin 2 是第一代荧光 Ca^{2+} 指示剂中的一种, 当被 339 nm 的电磁波激发后, 只要一与 Ca^{2+} 结合, Quin 2 的荧光物质释放量就会有 5~6 倍的增长。相反地, 当用 365 nm 波长激发时, 荧光物质释放

量会有所减少,因此在测量可见荧光物质所需浓度下,Quin 2 对 $[Ca^{2+}]_i$ 起了缓冲作用。基于以上原因,近年来 Quin 2 并未被看作单纯的指示剂,而是作为 $[Ca^{2+}]_i$ 的缓冲剂来使用。

2. Indo 1 Indo 1 是最流行的指示剂之一,这种指示剂的合成与 BAPTA (可螯合 Ca^{2+} 的物质) 相似。Indo 1 是一种 pH 值介于 6.0 至 8.0 范围内,而比 EGTA 对 pH 更敏感的螯合物,对 Ca^{2+} 选择性高于 Mg^{2+} 。Indo 1 比 Quin 2 的优点多,主要表现有以下几点:①与其他二价阳离子如 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 和 Zn^{2+} 相比,它与 Ca^{2+} 有更大的结合选择性;②与 Quin 2 相比,Indo 1 对 $[Ca^{2+}]_i$ 有更大的结合容量而较小的亲和力,因而对细胞内 Ca^{2+} 产生较小的缓冲,细胞内 Ca^{2+} 变化的动力学也更容易被观察。Indo 1 是符合比率测定法 (ratiometric measurement, 测定双波长的荧光比值) 的 Ca^{2+} 指示剂之一。Indo 1 最大的缺点是它的快速脱色,据报道,如果 UV 亮度不过度,那么脱色就不会产生太大影响。但由于快速脱色能降低信噪比,因而可能会低估了 $[Ca^{2+}]_i$ 的含量。

3. Fura 2 Fura 2 也是一种 UV- Ca^{2+} 指示剂,它也是符合比值测定法来测量 $[Ca^{2+}]_i$ 的指示剂。在比率测量时,在 340/380 nm 波长时的荧光比值常常作为衡量 $[Ca^{2+}]_i$ 的代表量。它是近十年来最常用的荧光指示剂,但它也有不足之处。如 Fura 2-AM 的区室化 (见后) 及与蛋白质结合要比 Indo 1-AM 明显,一旦发生区室化或与其他蛋白质结合就不能准确反映细胞浆内的含钙量。另有报道, Fura 2 也会分解成为一个对 Ca^{2+} 不敏感但在紫外线照射下具有荧光的混合物,从而影响了 Ca^{2+} 浓度比率测量的准确性 (发生高估现象)。

4. 吲哚 1FF, 呔喃 2FF, 镁-吲哚 1, 镁-呔喃 2 和镁-呔喃 5 Indo 1FF 和 Fura 2FF 是属于对 Ca^{2+} 具有较低亲和力的一类 Ca^{2+} 指示剂。有时,他们对于特殊的 $[Ca^{2+}]_i$ 测定非常有用,因为他们有非常高的 K_d 值,例如,他们可被用来测量 Ca^{2+} 浓度的快速变化和具有高 Ca^{2+} 水平的细胞内部隔区 (细胞器) 中的 Ca^{2+} 含量。已经证明 Indo 1FF 在放射波谱上有一道蓝色谱线并根据环境中蛋白质的浓度与类型,改变对 Ca^{2+} 的亲和力。镁-Indo 1、镁-Fura 2 和镁-呔喃 5 被作为指示剂来测量细胞溶质 Mg^{2+} 的浓度,大多数 Ca^{2+} 指示剂对 Mg^{2+} 的亲和力很低,这些指示剂表示出对 Ca^{2+} 很低但对 Mg^{2+} 却有很高的亲和力 (镁-Indo 1、镁-Fura 2 和镁-Fura 5 与 Mg^{2+} 结合的 K_d 值分别为 2.7、1.9 和 2.3 mmol/L, 这比 Fura 2 高出许多倍)。这些指示剂对 Ca^{2+} 的亲和力按顺序比 Indo 1 或 Fura 2 要低得多。当然也有报道用镁-Fura 2 测量刺激蛙骨骼肌所引起的 Ca^{2+} 浓度的快速反应,在电刺激下, Mg^{2+} 的变化要比 Ca^{2+} 的反应慢 2~3 倍。当用这些指示剂时必须注意考虑到 Mg^{2+} 的水平,因为有一种情况是潜在的,就是 Ca^{2+} 引起的光谱的改变,可能会被 Mg^{2+} 的改变所干扰。

5. 呔喃 PE3 和吲哚 PE3 这些分别是 Fura 2 与 Indo 1 的衍生物,他们的吸收与发光光谱几乎与 Fura 2 和 Indo 1 相同,但是他们在结构上附加的正电荷使之保持在细胞浆内的时间要比母体复合物长得更多。一些报道证明:他们比原有的 Fura 2 和 Indo 1 更可靠、更有用。因为他们的染料渗漏和区室化程度相对较低。但与 Fura 2 和 Indo 1 相比,他们更易结晶和沉淀,这就导致了细胞内指示剂负载效率的降低。Fura 2 的荧光能被 Mn^{2+} 淬灭,而 Fura PE3 只能被 Ni^{2+} 淬灭。

6. Bis-Fura 2 Bis-Fura 2 也是 Fura 2 的衍生物。Bis-Fura 2 与 Fura 2 相比,有以下几个特点:①散发荧光的强度是 Fura 2 的两倍,因而节省了染料的使用浓度;② K_d 值比 Fura 2 大,扩大了 Ca^{2+} 的测定范围 (500 nmol/L 以上);③它带负电荷使与钙的结合力增强。Bis-Fura 2 的缺点之一是它无细胞通透性,因而只能通过有创方法负载细胞。

7. C_{18} -Fura 2, FFP 18, FIP 18 C_{18} -Fura 2 和 FFP 18 是以 Fura 2 为基础而合成的新的 Ca^{2+} 的指示剂,而 FIP 18 是以 Indo 1 为基础。指示剂 C_{18} -Fura 2 经微注射法入胞浆膜内面,可估计位于胞浆膜附近 Ca^{2+} 的变化。但是 C_{18} -Fura 2 的 K_d 值 (150 nmol/L) 太低以至于不能反映胞浆膜内侧面较高浓度的 Ca^{2+} 变化。FFP 18 和 FIP 18 是更新的指示剂,也可测量膜附近的 $[Ca^{2+}]_i$,由于 FFP 18 的 K_d 值是 C_{18} -Fura 2 的 3 倍,可测量较高的 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化。另外,有必要在微注射时加 Ni^{2+} 以淬灭细胞外指示剂的荧光。已有报道指出所有 FFP 18 不仅仅只与胞浆膜发生联系,与胞核或肌质网也有联系。

8. **BTC** N-[3-(2-benzothiazolyl)-6-[2-[2-bis(carboxymethyl)-amino]-5-methylphenoxy]ethoxy]-2-oxo-2H-1-benzopyran-7-yl]-N-(carboxymethyl)-glycine (BTC) 也是一种双波长的 Ca^{2+} 的指示剂, 波长为 464 nm 或 400 nm, K_d 是 $7.0 \mu\text{mol/L}$, 比 Fura 2 和 Indo 1 大, 可测量较大量的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化。

(三) 可见波荧光指示剂

可见波长的 Ca^{2+} 指示剂比紫外波长荧光指示剂有更多优点: ①细胞内的自动或背景荧光少; ②可见波长的细胞毒性比紫外波长要少。

1. **氟化物 3 (Fluo 3)** Fluo 3 是由 BAPTA 和荧光样结构的化合物合成的。Fluo 3 的吸收和激发波峰值分别为 506 nm 和 526 nm, 它可被 488 nm 的氩激光激活, 而且随着 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的增加其发出的荧光素量也增加。据报道, Fluo 3 在结合 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 后的荧光量可增长 40~200 倍。因为 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 在许多细胞内增长的范围一般是 5~10 倍, 因此 Fluo 3 是一种具有高敏感度的 Ca^{2+} 探针。已经知道在离体条件下, Fluo 3 的 K_d 为 400 nmol/L (22°C , $\text{pH } 7.0\sim 7.5$), 但该 K_d 值易受细胞内 pH 值、粘度和结合性蛋白质的影响。Fluo 3 最大的缺点可能是它在结合 Ca^{2+} 后不能在吸收或发光光谱时显示变化, 这个事实使得它在单独使用时不能使用比值的方法来测定 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。Fluo 3 比值测定法可用长波 Ca^{2+} 指示剂的 Fura red 代替, 但是 pH 值应一直保持不变。此外, 由于 Fluo 3 的上述增敏作用, 在 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 不变时, 其测定的估计值可能已有变化。另外, 当用 Fluo 3 的 AM (在指示剂上连接的脂类结构, 使指示剂可透过细胞膜) 形式时, 测定时的定标比较麻烦。最近新的 Fluo 3 类似物 Fluo 4 及 Fluo 5 已经生产出来。

2. **钙绿** 钙绿像 Fluo 3 一样, 也是一种长波 Ca^{2+} 指示剂。其吸收和发光光谱与 Fluo 3 相类似, 但钙绿的荧光素量高出 5 倍于 Fluo 3。因此, 使用低浓度的钙绿就可以精确测量静息状态和刺激时 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的量。根据与 Ca^{2+} 的亲合力大小, 钙绿可分为 3 类, K_d 值分别是 190、550 和 14 nmol/L 。

3. **Oregon green BAPTA** Oregon green BAPTA 是建立在 BAPTA 基础上的新的 Ca^{2+} 指示剂。Oregon green BAPTA 在波长 488 nm 最有效。另外, 据报道 Oregon green 的结果较稳定, 其在生理 pH 值范围内不受 pH 值的影响。与钙绿或氟化物相比不同, 在一些类型的细胞中 (如大鼠肝细胞), Oregon green BAPTA 的荧光素量在细胞溶胶里会很快地减少, 部分原因可能是细胞膜上的转运体将其转运到细胞外所致。

4. **钙橘黄和钙深红** 钙橘黄和钙深红是以四甲基碱性蕊香红和 Texas 红为基础 Ca^{2+} 指示剂, 其吸收和发光光谱与碱性蕊香红和 Texas 红类似 (分别是 549 和 576 及 590 和 615 nm), 它们的 K_d 数值都为 185 nmol/L , 以稳定状态的荧光素强度数值为基础, 和其他可见波指示剂相比, 它们的 K_d 数值偏小。但是, 它们可用来定量测定大幅度 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的变化。

5. **呔喃红** 呔喃红在结构上和化学性质上都与 Fura 2 相似, 然而光谱变为红色, 这就削减了大多数细胞内原有荧光物质的干扰。和 Fura 2 相似, 呔喃红的光谱波长是 420 nm 和 480 nm (激发波长是 550 nm)。呔喃红对 Ca^{2+} 有最高的亲合力 (K_d 值为 140 nmol/L), 但呔喃红的荧光性远弱于 Fluo 3, 其负载浓度是 Fluo 3 的 2~3 倍, 因而限制了测量 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的范围。

6. **Rhod 2** Rhod 2 是 Tsien 和他的同伴发现的一种以蕊香红为基础的 Ca^{2+} 指示剂, 最近这种指示剂已被用来测定各种细胞线粒体内的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 。因为线粒体膜内外存在较大的电位差, 线粒体膜内为负, Rhod 2-AM 是一种多价离子, 可有效地在线粒体内聚集、水解。有人指出通过调整负载状况 (比如温度、时间等), Rhod 2 可选择性地在细胞内聚集, 其荧光量可如实地反映线粒体内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的水平。Rhod 2 与短波 Ca^{2+} 指示剂结合使用可在单个细胞内测定胞浆和线粒体中的钙。另外, Rhod 2 常被用来测定脑细胞中的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 这可能是由于 Rhod 2 是长波 Ca^{2+} 指示剂而不受细胞本身荧光的干扰。而且据报道, Rhod 2 比 Fluo 3 在脑组织中渗透得更深。

7. **共轭葡聚糖** 对于许多荧光指示剂来说, 区室化是个严峻的问题。减弱区室化的一个最有效的技术就是在指示剂上连接一个分子的葡聚糖, 其为一种分子量大于 10 000 的亲水性多糖。葡聚糖与指示剂

的结合物无法穿过细胞膜,因而需要一些侵入性技术,以便将其载入细胞内(如微注射术或穿孔式注入法)。一旦进入了细胞,这种结合物便可待在其中,并能在相当长的时间内提供细胞内离子浓度的标准信息。

8. 钙绿 C_{18} 和呋喃吲哚 C_{18} 它们都是基于钙绿和类呋喃红的复合物,是一种脂溶性的 Ca^{2+} 指示剂。它们能够固定在细胞膜上来反映细胞膜附近的 Ca^{2+} 浓度变化。然而,由于钙绿 C_{18} 带有负电荷,这会使指示剂沿着向外的方向排列。据报道,向成骨细胞内注入 5 mmol/L 钙绿 C_{18} ,然后在 37℃ 的条件下保持 10 min,90% 的钙绿 C_{18} 就会附着于成骨细胞的细胞膜的浆而上,因而钙绿 C_{18} 对于监测从细胞膜上外流的 Ca^{2+} 浓度是很有用的。

二、生物发光钙指示剂

(一) Ca^{2+} 结合型发光蛋白

生物光是生物有机体发出的光,人们发现了许多种 Ca^{2+} 结合型发光蛋白,例如水母发光蛋白(aequorin)、obelin、mitrocomin 和 clytin 等,其中有一些已被用来测定 $[Ca^{2+}]_i$ 。当这些发光蛋白在 Ca^{2+} 存在时,其分子内就会发生反应,发出可见光,因而可降低对检查设备的要求。另外,由于亮度较高,因而不会受到遮光性物质的影响。而对于这些探针物质来说,最大的问题在于怎样将其送到细胞内和对数值的效准。比方说,每分子水母发光蛋白结合了 Ca^{2+} 后,只放出一个光子,如果这样的话,所观察到的生物光便不足以用来测定细胞质内 Ca^{2+} 的浓度,因而有时需要附加较复杂的探测设备。

1. 水母发光蛋白(Aequorin) Aequorin 是一种名为 *Aequore forskaleade* 的水母中分离出来的最常用的生物发光型 Ca^{2+} 指示剂。自从 Ridgway 和 Ashley 于 1967 年用 Aequorin 短暂的测量到巨生藤壶肌纤维中的 Ca^{2+} 浓度之后, Aequorin 便被广泛的用作 Ca^{2+} 指示剂。Aequorin 复合物由分子量为 21 000Da 的脱辅基发光蛋白、coelenterazine 发光团和氧分子组成。水母发光蛋白有 3 个 Ca^{2+} 结合位点,当 Ca^{2+} 结合到其中 2 个位点时,它便发出生物光。当 Ca^{2+} 结合到 Aequorin 上时其中的氧分子便被释放,coelenterazine 就被氧化成 coelenteramide 而导致其发出蓝光(465 nm)。水母发光蛋白可由脱辅基发光蛋白和 coelenterazine 在有氧条件下重新合成。当 $[Ca^{2+}]_i$ 在 $10^{-7} \sim 10^{-4}$ mol/L 之间变化时就会导致发光的增强。在 $[Ca^{2+}]_i$ 较高时,如果 Ca^{2+} 并没有均一的分布于细胞质中,有时会导致对 $[Ca^{2+}]_i$ 的过高估计。不幸的是,有些细胞在静息状态下其内的 $[Ca^{2+}]_i$ 十分接近用 Aequorin 可测值的范围,Mg 也会降低 Aequorin 对 Ca^{2+} 的敏感性,但酸碱度对它毫无影响(在生理 pH 值范围内)。一般认为进入细胞内的 Aequorin 只会待在胞质中,而不会进入细胞器。20 世纪 80 年代后期,由于技术的发展,用类 coelenterazine 取代了 coelenterazine,各种人工的 Aequorin 合成物相继被研制出来,这些物质提高了对 Ca^{2+} 的敏感性。

2. Obelin Obelin 是一种 Ca^{2+} 激活的发光蛋白。它是从 *Obelia geniculata* 的水解产物中提取出来的。当 obelin 结合了至少 3 个 Ca^{2+} 时,他便发出生物光。从与 Ca^{2+} 结合到发光这一过程(3 ms)要比水母发光蛋白(10 ms)快的多,因此对于快时分析来说是很好的指示剂。其缺点是对 Ca^{2+} 的敏感性不如水母发光蛋白,特别是在 $[Ca^{2+}]_i$ 低于 $10^{-5.5}$ mol/L 的情况下。

3. 特殊目标的重组水母发光蛋白 重组的 Aequorin(水母素)是一个十分有用的测定细胞器内 Ca^{2+} 浓度的探针。Rizzuto 和其同事将编码水母素的 cDNA 附于编码的线粒体的 cDNA 框架上,这种杂交 DNA 被转入细胞,并成功地得到了稳定克隆表达的定位于线粒体的水母发光蛋白。这种方法使人们能够监视正常条件下人体内特定细胞器中 $[Ca^{2+}]_i$ 的水平,而对细胞丝毫无损。应用不同的预先编码方式,就可广泛地监测细胞各种亚单位中的 $[Ca^{2+}]_i$ 的水平,如细胞核、肌浆网、内质网、高尔基复合体、分泌颗粒、线粒体、缝隙连接和细胞质等。应用目标重组水母素的最大好处是:①细胞完好无损;②只反映特定细胞器内的 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化。然而,虽然此方法应用广泛,但在细胞内某些 $[Ca^{2+}]_i$ 较高的亚单位(如肌浆网、内质网)中,会因水母发光蛋白的过快消耗而使测定变得困难。最近有报道说:已经用重组 coelenterazine 的方法合成出了具有较低的 Ca^{2+} 亲和力的水母素,这样它的消耗就会慢些,因而可以提供

对高 $[Ca^{2+}]_i$ 区域更可靠、更长时间的 $[Ca^{2+}]_i$ 监测。

(二) 绿色荧光蛋白基 Ca^{2+} 指示剂

绿色荧光蛋白 (GFP) 是从澳大利亚水母 (*Aequorea victoria*) 体内提取的光敏蛋白。这种蛋白吸收了蓝色的生物光后, 便在体内放出绿色荧光。对 GFP 的克隆成功及将编码其的 cDNA 成功附于细胞器的 cDNA 上, 使它成为了一种活体中基因表达和蛋白质定位的标志。GFP 已成为了细胞生物学实验室最常用的最成功的新技术之一。最近一些研究室用 GFP 成功地合成了 Ca^{2+} 指示剂。

1. **Chameleon** Chameleon 是 Miyawakiz 等人成功地在海拉 (HeLa) 细胞的细胞浆和内质网中表达出了 GFP 基 Ca^{2+} 指示剂, 他们由两个可发出不同波长荧光的 GFP 突变体组成: Ca^{2+} 敏感性蛋白 (calmodulin, 钙调蛋白) 和 M13 (肌球蛋白轻链激酶的 26 个可与 calmodulin 结合的氨基酸残基)。这种杂交蛋白 (calmodulin-M13 复合物) 连接两个 GFP 变体, 当 Ca^{2+} 结合到此复合物上的钙调蛋白上时, 杂交蛋白便改变其构型导致两个 GFP 变体基的距离缩短和荧光谐振能量转化的增加 (FRET)。Tsien 展示了两种 GFP 变体和供体的结合物, 它们是蓝色荧光蛋白 (BFP)-GFP 和氰荧光蛋白 (CFP)-黄色荧光蛋白 (YFP), 其发光波长和激发波长比分别达到了 $(380\sim510)/445$ 和 $(440\sim535)/480$ nm。在他们合成的多种 chameleon 中, chameleon-1/E104Q 含有 BFP 和 GFP, 在 $[Ca^{2+}]_i$ 波动于 $10^{-7}\sim10^{-4}$ mol/L 时, 表现出了对 $[Ca^{2+}]_i$ 的单向响应性, 后将其上的 BFP 和 GFP 改进为增强型的 CFP 和 YFP, 其亮度、信噪比、耐久性都有所增加 (黄色 chameleon-2)。然而, 无论是 chameleon-1 还是 chameleon-2 都没有在发光比上有多大改进, 两个的 R_{max}/R_{min} (见后) 都小于 2, 比化学荧光 Ca^{2+} 指示剂小得多。

2. **FIP-CBSM 和 FIP-CA** 不同的 GFP 基 Ca^{2+} 指示剂——荧光指示蛋白 (FIP) 已经由 Romoser 和 Persechini 及其同事合成, 合成的 GFP 复合物是 FIP-CBSM。他们用微注射法将 FIP-CBSM 注入细胞中, 用以监测细胞质和细胞核中的 $[Ca^{2+}]_i$, 其激发光的波长为 505 nm, 发光波长是 380 nm。当 $(Ca^{2+})_4$ -calmodulin 复合物同 FIP-CBSM (K_d 0.4 nmol/L) 结合时, 它便改变其结构, 导致两个 GFP 变体之间的距离增加 (25~65 Å), 根据他们的报道, 对 Ca^{2+} 灵敏度的范围为小于 50 nmol/L 到 1 μ mol/L。然而, 由于 FIP-CBSM 是一种 $(Ca^{2+})_4$ -calmodulin 复合物指示剂, 它测定 $[Ca^{2+}]_i$ 的能力便受到了细胞中的 calmodulin 浓度的限制。

这些 GFP-基 Ca^{2+} 指示剂同化学荧光探针和水母发光蛋白相比来说有一些优点。同水母发光蛋白相比: ①适用于比值法对 $[Ca^{2+}]_i$ 的测定; ②荧光反应是可逆的, 并且不需要特殊的辅助因子; ③较强的荧光使人们可以用一些简单的光探测系统和较普通的分析方法; ④同化学荧光探针相比, 灵敏度或对 Ca^{2+} 的亲合力无浓度依赖性; ⑤可测定细胞中的各亚单位 (如细胞质或细胞核) 内的 $[Ca^{2+}]_i$; ⑥他们可被精确地表达于目标细胞器之上, 虽然 rhod 2 也可以定位于某些细胞之内, 但对于大多数化学荧光指示剂来说, 将他们定位于包括内质网和核在内这样的目标细胞器上是很困难的, 新型的 GFP-基指示剂有潜力克服化学指示剂和重组水母发光蛋白的缺点。

从另一方面讲, GFP-基 Ca^{2+} 指示剂也有一些缺点, 其中的一个缺点是其荧光强度的变化区域较小, 正如上面所谈到的, 它们中大多数的 R_{max}/R_{min} 小于 2, 而 Fura 2 和 Indo 1 的此项值在 1~20, 此值较大的意义在于较容易分辨变化较小的荧光比值。Fluo 3 的 F_{max}/F_{min} 值大于 100, 但由于它们的光谱性质, 荧光比的基线不总在 0, 这便不能测定 0 附近较小的荧光比变化。另一个潜在的缺陷是 GFP 的荧光性对酸碱度特别敏感 (特别是 YFP)。Llopis 等人已经证明, GFP 和 YFP 对生理酸碱度条件下的 pH 值变化更敏感 (pK_a 7.1), Romoser 等人也提及 FIP-GA 的酸碱敏感性。

三、指示剂负载方法

(一) 酯负载法

对一些植物细胞可直接负载 Ca^{2+} 指示剂。但大多数化学荧光指示剂是无法渗入细胞的, 对于大多数细胞而言, 需采用特殊侵入性方法或生化技术使指示剂进入细胞。把许多 Ca^{2+} 荧光指示剂与具有细胞通

透性的脂基团-AM 相连接形成指示剂-AM 的形式,同其原本的活性形式不同,AM 形式的指示剂能够被动地穿过细胞膜而扩散入细胞内。一旦进入了细胞,脂酶便将 AM 与指示剂水解分离,这样指示剂便无法透出细胞。一般认为,细胞内水解得到的 Ca^{2+} 指示剂的浓度是受许多因素影响的(如 Ca^{2+} 指示剂的种类、 Ca^{2+} 指示剂溶液的浓度、扩散时间、扩散温度,选定的细胞数目以及扩散前的生理条件等)。但由于 AM 的水溶性较差,一般加用 Pluronic F-127 或 Cremophor EL,使负载更容易。Pluronic F-127 是一种非离子试剂,用于促溶大分子染料。如果需要的负载时间较长,则可在溶液中加入 1 mg/ml 的 BSA 或 1%~5% 的 FCS,以便维持适当的渗透压浓度。然而,由于 FCS 有时会含有一些非特异性的脂酶,它会使 AM 形式的指示剂在进入细胞前就被水解掉。脂负载法除了适用于将染料负载入培养的分出来的细胞外,还适用于将染料负载入整个器官(如分离的心脏),而且并不损伤其生理状态。然而,AM 负载法也有各种各样的问题,如区室化作用和水解不完全等。

(二) 微注射法

化学荧光 Ca^{2+} 指示剂不是都有可渗入细胞内的脂的形式,更棘手的是,有些葡聚糖结合物和发光蛋白的体积太大,以至于无法通过细胞膜,因而只有用一些特定的技术,才能将这些指示剂送入细胞内。具体是 Ca^{2+} 指示剂可以溶解于一种类胞质的溶剂中,将这种溶液吸入一个玻璃微管中,再将它插入细胞中,将溶液间歇的注入细胞内(用 N_2 压入)。这种方法的好处是可以将带电形式的指示剂很可靠的直接注入细胞内,不过该方法是侵入性的,并需要专业设备和操作,同 AM 负载法相比,能够被负载的细胞数目是很有限的(最好的微注射器每小时可注射大概 100 多个细胞),如果要注射一块组织中某些特定的细胞,这种方法也较困难。

(三) 通过膜片钳注入法

虽然微注射法对大细胞很有效,但在针头刺穿细胞膜时,有时会使较小的细胞受损,对一些小细胞来说(如肥大细胞,肾上腺内的嗜铬细胞),常用膜片钳把染料注入细胞内。这种方法不仅能记录细胞膜电流,同时可被用作测定可兴奋性细胞内的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (如神经元、心肌细胞)。吸管可源源不断地提供 Ca^{2+} 指示剂,并能防止细胞内的染料从小洞中漏出而导致细胞内指示剂浓度过低。同微注射技术用外部压力将指示剂压入细胞内不同的是,染料是通过膜片渗入细胞内的。因此指示剂能否达到稳定的渗入速率取决于吸管口处的电阻及渗透液的粘度。不过,用吸管扩散有时可能使细胞裂解,有时还会降低细胞的寿命,而另一个缺点是这种方法不能同时将染料送入多个细胞。

(四) 化学负载技术(低 Ca^{2+} 负载)和大口径吸管注入法

下述方法是基于将染料渗入一块组织或器官中的大量细胞的需要而发展起来的。由于微注射法在注射水母发光蛋白时需要进行 50~100 次才能得到令人满意的反应,因而这不是一个把染料注入组织或器官中满意的方法,而大口径注射术(macroinjection)应用一个口径更大的吸管,能将染料同时送入多个细胞内。此法需要一些附加的化学处理,先将组织块置于低 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 灌注液中,使细胞膜的通透性短暂增高,然后将指示剂从吸管压入组织内,最后将灌注液中的 Ca^{2+} 逐渐恢复到正常范围内。用这种方法,心肌或分离出来的乳突肌上靠近注射处的心肌细胞,就被载入了水母发光蛋白。虽然大口径吸管注入法操作简便,但其可靠性较低。

(五) 从缝隙连接处渗入法

这种技术是将 Ca^{2+} 指示剂经由具有短暂通透性的缝隙连接处渗入细胞。Lakatta 的研究小组使用了这项技术,她们用含有胶原酶和蛋白酶的低 Ca^{2+} 溶液逆向灌注小鼠心脏后,将其放在含有 Indo 1 的缓冲液中分离细胞,Indo 1 可机械地渗入细胞内。他们认为,一些缝隙连接对外部溶液在一定程度上是能够保持其通透性的,这样 Indo 1 可从这里渗入细胞内。这项技术的发明虽使 Ca^{2+} 指示剂负载细胞的工作变得简单,然而进入胞质内的染料的浓度有很大变化,在定标和对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 进行估计时需要认真分析这些因素的变化。

(六) ATP 诱导的通透性

细胞外 ATP 可对细胞产生许多作用, 在一些细胞 (如肝细胞、肥大细胞、多形核细胞、白细胞, 还有一些变形细胞), 细胞外 ATP 通过作用于 ATP⁴⁻受体, 导致离子流动, 并能改变细胞膜的通透性。ATP⁴⁻诱导的通透性法已用来负载多种染料 (<900 Da), 如将 Ca²⁺指示剂注入鼠巨噬细胞和变形的类巨噬细胞系。由于 Mg²⁺可抑制 ATP⁴⁻导致的通透性的增加, 因而其可控制细胞负载的程度。该方法的一个缺点就是仅适用于 ATP 可诱导通透性增加的上述部分细胞。

(七) 低渗透休克处理法

低渗透休克处理法 (Hyposmotic shock treatment, HOST) 是将水母发光蛋白负载到各种细胞中 (包括培养的和分离的细胞) 的负载方法。细胞首先用低温无 Ca²⁺溶液冲洗几遍以去除细胞外液中能消耗大量水母发光蛋白的 Ca²⁺, 然后把细胞移入含有低渗溶液的管中, 和水母发光蛋白混合在一起 2~5 min。在这期间, 细胞浸在低渗溶液中, 指示剂可经质膜渗透并进入细胞。尽管 HOST 法可以把染料高效率地载入细胞内, 但是低渗透休克处理法将会使细胞的存活力降低和功能的完整性受到破坏。

(八) 重力负载法

当细胞悬在溶液中时, 重力负载技术将会是最简单最可行的水母发光蛋白负载法。细胞在无 Ca²⁺溶液中冲洗 3 次, 每冲洗一次后在 50 g 离心 2 min, 这时再把细胞与水母发光蛋白混合在一起保存于 4℃ 的温度下 10 min, 接下来再 200 r/min 离心 30 s, 确切的负载机制尚不清楚。此种方法的水母发光蛋白的结合率与下述的刮载法相近, 但只是 HOST 法的 30%。

(九) 刮载法 (刮除负载技术)

刮载法 (Scrape loading) 是将高分子指示剂负载到细胞内的一种方法, McNeil 是这项技术的先驱。在含有指示剂的缓冲溶剂中将培养皿板上的细胞刮下, 再将细胞冲洗后移到别的培养皿中培养。有人认为这种方法可在质膜上撕开小洞, 使不通透细胞的荧光性指示剂或者被标记的高分子可以负载到细胞上, 而且效率较高。这种方法的一个不足就是向刚分离出来的细胞中负载染料较难, 因为它们不能呈单细胞层样附着于培养板上。

(十) 脂转运法

这种方法是将指示剂与具有膜透性的 40~50 nm 的阳离子微脂粒融合在一起, 这种方法的效率取决于所用离子试剂的种类、细胞类型及培养条件。染料通过微脂粒的负载也可以引起别的外源性的脂类进入细胞, 这将有可能会改变细胞的特性。

四、钙指示剂的定标和估计

用荧光定量测定 [Ca²⁺]_i 必须进行定标, 这一点尤为重要, 此法可以分为体外定标和活体 (在体) 定标两种方式。

(一) 体外定标

钙浓度与荧光强度有关:

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \times (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F) \quad (\text{单一波长测量法})$$

$$\text{或 } [\text{Ca}^{2+}]_i = \beta \times K_d \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) \quad (\text{比率测量法})$$

在上述公式中 F 和 R 分别是实验测量的荧光强度和比率; F_{min} 和 R_{min} 分别为无 Ca²⁺时的荧光强度和比率; F_{max} 和 R_{max} 分别为 Ca²⁺饱和时的强度和比率; β 是与某一选定的波长有关的比率系数, K_d 是 Ca²⁺指示剂的解离常数。

校正曲线通过用含 Ca²⁺指示剂的缓冲液获得。EGTA-Ca²⁺缓冲液是最常用的 Ca²⁺指示剂的校正方法, 不同 Ca²⁺浓度的一系列校正溶液可用两种溶液按不同的比例混合而成 (A 溶液含有 10 mmol EGTA, B 溶液含 10 mmol Ca²⁺-EGTA)。两种溶液都含有相同浓度的 K⁺ (100~140 mmol/L)、缓冲液 (MOPS、HEPES

等)和其他需要的离子,并且调定到同一 pH 和温度。例如,我们可以按下面的方法准备 Ca^{2+} 缓冲液,以取得一组 Ca^{2+} 的测量标准:①20 ml A 溶液(无 Ca^{2+} 溶液),含有 100 mmol/L KCl、10 mmol/L K-MOPS、10 mmol/L $\text{K}_2\text{H}_2\text{EGTA}$ 及 1~5 $\mu\text{mol/L}$ Ca^{2+} 指示剂, pH 为 7.2 (KOH 调定),并将 A 溶液分成两份;②1 ml 1 mmol/L 的 CaCl_2 溶液,用 MOPS 缓冲液(100 mmol/L KCl 和 100 mmol/L K-MOPS)稀释 10 倍;③5 μl 0.1 mmol/L CaCl_2 缓冲溶液缓慢加入 10 ml 的 1 mmol/L EGTA 溶液中同时观察 pH, CaCl_2 的加入将会导致 pH 下降并最终稳定;④记下用来获得稳定 pH 的 0.1 mmol/L CaCl_2 溶液的体积;⑤B 溶液(Ca^{2+} 饱和溶液)是把在步骤 4 中得到的确定体积的 1 mmol/L CaCl_2 溶液加入到 10 ml A 溶液制得,并且用 KOH 将 pH 调到 7.2;⑥将 A 溶液和 B 溶液按多种比例混合(0~100%,每次递增 10%)制成 11 份溶液, $[\text{Ca}^{2+}]$ 可以通过下面的方程和 EGTA 中 Ca^{2+} 的 K_d 值得出:

$$[\text{游离 } \text{Ca}^{2+}] = K_d \times [\text{Ca}^{2+}\text{-EGTA 复合物}] / [\text{游离 EGTA}]$$

因为游离 Ca^{2+} 浓度只有 Ca^{2+} 总浓度的 10^{-6} 倍数量级, Ca^{2+} -EGTA 复合物和游离 EGTA 可约等于 Ca^{2+} 的总浓度, Ca^{2+} 总浓度可用 B 溶液浓度代替,游离 EGTA 实际上以 A 溶液浓度表示,所以方程可化为:

$$[\text{游离 } \text{Ca}^{2+}] = K_d \times [\text{B 溶液}] / [\text{A 溶液}]$$

因此,由于 EGTA 中 Ca^{2+} 的 K_d (例如在 20°C、pH 为 7.2 时是 150.5 nmol/L) 和 A 溶液与 B 溶液的比例已知,那么 $[\text{Ca}^{2+}]$ 可以估算得出。

由于 EGTA 中, Ca^{2+} 的 K_d 受温度、pH、离子强度和其他金属离子的影响,所以在校正 Ca^{2+} 指示剂之前有必要测定缓冲液中 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的精确值。

(二) 活体定标

我们知道, Ca^{2+} 的 K_d 估计值在体外和在细胞内是不同的,这个矛盾在于含 Ca^{2+} 指示剂的细胞内 K_d 受温度、pH、粘度、离子强度和其他细胞内成分的影响,所以在一种细胞内测定的 K_d 值对于其他细胞是不适用的。另外,细胞内环境也影响某些 Ca^{2+} 指示剂的光谱。已被证明,Indo 1 和 Fura 2 在细胞内环境下和在缓冲液中展现出不同的放射吸收光谱,产生这种矛盾的部分原因可能是细胞内物质的合成与分解、极性变化以及环境的变化。另外,除非所有的 AM 完全水解,否则残余的 AM 产生的荧光可能影响从细胞中观察到的荧光,因而影响数据的准确性,所以未水解的 Ca^{2+} 指示剂是不灵敏的,对它们荧光信号的测定可能会导致对 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的低估。因此更好的方法是活体标定 Ca^{2+} 指示剂的荧光强度。

无荧光的 Ca^{2+} 离子载体(通道开放剂)如 ionomycin 和 4-溴-A-23187 已被用来细胞内外的 Ca^{2+} 水平,通过用 EGTA- Ca^{2+} 包含低含量的这些试剂的缓冲方法,可获得在体时 Ca^{2+} 指示剂的标准曲线。尽管如此,这些试剂依然有缺点:①尽管高含量的 Ca^{2+} 离子载体不仅增加了细胞浆膜的通透性,而且增加了胞内器官的通透性,但平衡所有细胞器的 Ca^{2+} 水平仍有困难;②有些 Ca^{2+} 离子载体可以把细胞内 Ca^{2+} 浓度增高到饱和,但对于某些低亲和力的 Ca^{2+} 指示剂是困难的;③对于某些类型的细胞(如心肌细胞)通过 Ca^{2+} 载体来增加 Ca^{2+} 浓度,会引起细胞体积和形态的变化,这样胞内染料的浓度或者荧光比率可能被改变。耗尽 ATP 及葡萄糖或使用羟基氢化物 m-氯苯胺和鱼藤酮有时能有效地阻止心肌细胞收缩过度。当 Ca^{2+} 载体不易通过细胞的浆膜时,有时可用去污剂如洋地黄皂苷或 Triton X-100 代替 Ca^{2+} 载体。

另一种常用的细胞内标定方法是用微注射缓冲液代替通过离子载体来平衡细胞内外 Ca^{2+} 的浓度,用缓冲方法通过微管和微注射针来控制 Ca^{2+} 浓度。如果用微注射法,缓冲液的 Ca^{2+} 浓度要持续增加到荧光比率变得稳定,计算多个细胞的平均值得到标定曲线,因为测定单一细胞的标定值是不准确的。这种方法的缺点是胞内环境(如粘性、渗透压、离子强度、胞内蛋白的相对浓度)就会在注射后改变,而且这种技术不能用于无比值法测定的离子指示剂,因为它可能会改变染料的浓度。

许多 AM 形式的 Ca^{2+} 指示剂(如 Indo 1、Fura 2、Fluo 3 和 Rhod 2)很容易与 Mn^{2+} 结合而不发荧光。而当 AM 形式的 Ca^{2+} 指示剂负载于细胞时,经常发生不完全水解和区室化现象等,这些现象的产生都会使指示剂对细胞液中的 Ca^{2+} 不敏感而应从细胞的全部荧光中扣除。

(三) 荧光强度的估计

正如以上讨论的一样,通过测定 Ca^{2+} 最大最小浓度时 Ca^{2+} 指示剂的荧光强度,能够估算 Ca^{2+} 的浓度。在比率法的测定中,用低含量的 Ca^{2+} 指示剂可测定 RMAX、RMIN,因为理论上比率和染料的浓度是不相关的。然而在单波长的测定中,测定 FMAX、FMIN 则不可能,除非染料浓度得到准确地核定或在体定标是在同一细胞上测得的。近来,像对这些不适用于比率测定法的 Ca^{2+} 指示剂的荧光强度的测定已有许多报道,用比率 $\Delta F/F$ 表示如下:

$$\Delta F/F = (F - F_{\text{base}}) / (F_{\text{base}} - B)$$

F 是 Ca^{2+} 指示剂的荧光强度, F_{base} 是刺激前细胞内 Ca^{2+} 指示剂的荧光强度, B 是细胞附近区域的背景信号。如果染料浓度、细胞内环境和路径长度等都保持不变, $\Delta F/F$ 非常接近 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的真实值。

(四) 水母发光蛋白的评估

水母发光蛋白的生物发光可用分数 L/LMAX 表示, L 代表测定的光强度, LMAX 代表饱和 Ca^{2+} 浓度时的光强极值。在 10^{-6} mol/L $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的数量级,水母发光蛋白的发光强度与 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的浓度成正比, LMAX 代表负载的水母蛋白的总荧光。实验结束后,可从用 Triton X-100 使其从细胞中释放出的全部发光中测定。如果负载的蛋白浓度可以准确地测定,那么这个过程是不需要的(如微注射法)。

五、 Ca^{2+} 指示剂的潜在问题及解决办法

(一) 细胞内缓冲

一般来说,离子指示剂的功能与螯合物一样,是针对特定离子的,一旦离子与指示剂相结合,就改变了指示剂荧光的特性(吸收性、寿命、强度及光谱),同时在这一过程中,指示剂对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 发生了细胞内缓冲。实验证明,当高浓度的高亲 Ca^{2+} 的指示剂如 Fura 2、钙绿-1 等进入细胞内后,将会缓冲 Ca^{2+} 浓度的微小变化。例如, Fura 2 在常规浓度时,对 Ca^{2+} 的缓冲力是平滑肌细胞溶胶本身缓冲力的 10%~20%。因此,在这种情况下常用低亲 Ca^{2+} 的指示剂来测定 $[\text{Ca}^{2+}]_i$,但低亲 Ca^{2+} 的指示剂需要在细胞内形成较高浓度才可以获得好的观察信号。

一些早期的 Ca^{2+} 指示剂(如 Quin 2、Fura 2)现在经常用作 Ca^{2+} 的螯合物来测定细胞内部本身 Ca^{2+} 的缓冲容量,他们有很高的 Ca^{2+} 亲和性(K_d 值分别为 60 nmol/L 和 224 nmol/L),可以与细胞本身的缓冲组成成分相竞争,这种缓冲作用一般在几毫秒内发生。

(二) 细胞毒性

许多指示剂可能对某些类型的细胞具有毒性。众所周知,许多慢反应电位指示剂能作用于线粒体的氧化还原代谢和细胞增殖。例如碱性茜香红-123 在多次冲洗时不能存在于一般细胞的线粒体内,但它存在于癌细胞和心肌细胞线粒体内,从而抑制细胞的增殖。据报道,Fluo 3 负载的海胆卵不能正常生长,而用钙绿负载的海胆卵却能发育正常。

(三) 自发荧光

许多细胞结构能单独地发出荧光,结缔组织成分如胶原纤维和骨化组织能自动发射荧光,其影响作用一般不大。但从细胞核的 NADH、NADP、FAD 和 FMN 等结构发出的荧光可能是影响测定 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的最大问题。NADH 和 NADP 的含量减少时可增加荧光, FAD 则在氧化时增加荧光。NADH 激发及放射荧光的波长是 340 nm 和 $440\sim 470 \text{ nm}$, FAD 则是 450 nm 和 $530\sim 550 \text{ nm}$ 。用有些波长短的指示剂包括紫外线指示剂时,如果细胞内成分的自发荧光强到会影响到指示剂的发光时,有必要去估测一下自发荧光并加以扣除。这个问题在处理脑切片和肌肉组织的研究时特别棘手,因此,许多研究人员最近改用长波段的试剂如 Rhod 2 或呋喃红去减少自发荧光。

(四) 脱色

光照所有的荧光试剂可以引起成像的破坏和脱色,因此许多测量方法使用一些尽可能延缓产生这种影响的试剂。非比值测量法的试剂对脱色最为敏感,但减少比值测量法试剂的脱色同样重要,因为试剂在不同激发波长时的脱色率并不相同,这会产生错误的干扰因素,其结果是估计离子浓度时会出错。减

少脱色的办法是在试剂所处的环境除去氧气或在灌注液中加一些抗氧化剂,但对有些细胞不能任意实施。

在负载脂形式的试剂时,水解后的指示剂可确切地反映出细胞内离子的浓度。然而有实验表明,不完全水解的指示剂通常对 Ca^{2+} 不敏感但比含脂指示剂发出更多的荧光,显示的荧光光谱与对 Ca^{2+} 敏感的水解后的指示剂有明显不同。因此,在负载后要尽可能等到该类指示剂在细胞内彻底水解后再行实验,一般在 2 h 以上为宜。

(五) 区室化

用化学荧光试剂最重要的问题是区室化,区室化的意思是指指示剂并不是理想地、均一地分布在细胞浆内,而是可被细胞内的细胞器所摄取,如线粒体等,从而使其分隔成不同区域。在测量细胞溶质内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 时,一方面要把高浓度的荧光试剂负载入细胞浆中,另一方面要尽可能减小区室化的程度。因为在这些区域内的 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平较高,会影响 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的测定。区室化程度依赖于诸多的因素:负载条件、细胞种类、指示剂类型等。同一指示剂其区室化在不同种类的细胞可能发生于不同的细胞器。例如, Fura 2 的区室化现象在内皮细胞发生于线粒体,在成纤维细胞发生于溶酶体,小鼠的肥大细胞发生于分泌小管。产生区室化的原因可能是:①在不同细胞器具有阴离子转运系统的调控;②有些不完全水解的指示剂因其具有脂的特性可以继续穿过细胞器的膜结构而进入细胞器,并为细胞器内的脂酶水解;③指示剂与细胞浆脂酶或不同细胞器内脂酶的亲和力有差别,亦可导致区室化的多样性。脂解过程是由指示剂的脂形式变为整合结构的形式,其本质是生物化学反应,进入细胞的染料浓度、脂解过程和区室化等受温度影响很大。因此,可通过改变负载的温度(降低温度),减少区室化现象的发生。

用洋地黄皂苷或 Triton X-100 可得知指示剂区室化的程度。洋地黄皂苷是一种类固醇底物型非离子润滑剂,衍生于紫洋地黄皂苷,它于膜中由类固醇和其他非结合性 β -羟甾类固醇组成。它可以导致细胞膜对无机离子、代谢产物和酶的渗透性增加,但不影响细胞整体结构。因为细胞膜中类固醇与磷脂的克分子摩尔数比值大大高于细胞器中的克分子比,低浓度的洋地黄皂苷(10~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)可选择性地增加浆膜的渗透性,导致细胞浆液中的指示剂释放,但保留了细胞器内的区室化部分。Triton X-100 也是一种非离子润滑剂,但它可以用来释放细胞器内的指示剂。

最近,一些科学家试图利用区室化来测定细胞器中 Ca^{2+} 的含量,特别是有效地测定线粒体中 Ca^{2+} 的含量。用 Mn^{2+} 淬灭细胞浆中 Ca^{2+} 指示剂的荧光性后再行对线粒体中 Ca^{2+} 的估计。有些研究显示 Rhod 2 可以很好地负载于线粒体中,并已测定了一些细胞中线粒体内的 Ca^{2+} 含量(如肝细胞、心肌细胞、星形细胞、胶质细胞、肾上腺嗜铬细胞和淋巴细胞等)。用共聚焦显微方法以及细胞器特殊染料和离子指示剂联合的方法,也能测定细胞器内特殊离子的浓度。这种技术最流行的例子是用 Ca^{2+} 指示剂(如 Fluo 3 或钙绿)和电位指示剂(如罗丹明-123 或 TMRM)双染细胞以测定线粒体内的 Ca^{2+} 含量。这种双染指示剂的方法能够在特定的细胞器中同时测定 Ca^{2+} 和其他功能(如 pH、膜电位)的变化,也有经常使用该技术测定内质网和(或)肌浆网中的 Ca^{2+} 含量。尽管一些 Ca^{2+} 指示剂能成功地通过改变染料负载的浓度、时间、温度而指向特殊的细胞器,但有些指示剂在一些不同细胞中有载入某一特殊细胞器的倾向。例如在肝细胞、胃上皮细胞、促性腺细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞、星形细胞,镁-呋喃 5 和镁-呋喃 2 等及 Indo 1 更容易负载于肌浆网或内质网中而不是线粒体。这种倾向可能部分地决定于每种细胞器内水解酶效力的不同。尽管如此,即使这些指示剂载入了细胞器,但大部分仍保留在细胞浆液内。

(六) 结合其他离子和蛋白质

许多 Ca^{2+} 指示剂可与细胞内的蛋白质结合,而改变它们的荧光特性。已报道肌浆内 80%~90% 的 Fura 2 会溶于肌浆蛋白质。指示剂与蛋白质结合的程度由所用的指示剂类型和负载的条件来决定。一些 Ca^{2+} 指示剂与蛋白质结合后,其与 Ca^{2+} 的亲和力及光谱特性都发生了变化。例如,当 Indo 1 与蛋白质结合时,Indo 1 显示发光光谱向蓝色的转移,导致了错误的测 Ca^{2+} 结果。

此外,所有指示剂都受细胞内其他离子的影响。 Ca^{2+} 指示剂的 K_d 数值随 pH 值变化而敏感度发生变化。如当 pH 值从 7.4 变化到 6.5 或 5.5 时,三种最普通的 Ca^{2+} 指示剂 Indo 1、Fura 2 和 Fluo 3 的 K_d 值将

分别增加 1.4~1.7 倍和 7.1~11.8 倍, 因此, 在酸性条件下检测 $[Ca^{2+}]_i$ 时应该对此引起重视 (例如在心肌缺血再灌注或测定溶酶体中的 Ca^{2+} 含量时)。尽管已经很明确 Ca^{2+} 指示剂对 Mg^{2+} 有不同的亲和力, 但他们还可结合细胞内其他的重金属离子, 例如可与 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Ba^{2+} 和 Cd^{2+} 等结合。而且 Fura 2、镁-呋喃 2 和 Indo 1 对 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 等离子的亲和力要比对 Ca^{2+} 的亲和力更高 (对 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 的 K_d 值分别是 2.8、3 和 145 nmol/L)。尽管 Mn^{2+} 和 Co^{2+} 强烈抑制 Fura 2 和 Indo 1 的荧光, 且 Fura 2 和 Indo 1 不管是否结合于 Zn^{2+} 或 Ca^{2+} , 他们的光谱特性是相似的, 因而测定 Ca^{2+} 含量的变化是可靠的。

(七) 染料渗漏

在很多种细胞, 指示剂可从细胞内液渗漏到细胞外液中, 这种渗漏可能源于细胞膜上的负离子转运系统的分泌作用, 该作用可用丙磺舒或低温条件加以抑制或终止。负离子转运系统的分泌率大小部分地决定于细胞的类型。据报道, 在 37℃ 孵育 10 min 后, 在 N2A 型神经瘤细胞溶胶中有 40% 的 Fura 2 发生了渗漏, 而在 J774 型巨噬细胞溶胶中仅有 15% 的 Fura 2 发生了渗漏。呋喃 2 从神经胶质细胞中渗漏出来的速度比从神经元中渗漏出来的速度快得多。很多资料已经证明了不同 Ca^{2+} 指示剂的渗漏现象, 如 Fura 2 可从平滑肌细胞、星形细胞、嗜铬细胞、胰腺 β 细胞渗漏; Indo 1 可从胰腺 β 细胞中渗漏; Fluo 3 可从淋巴细胞中渗漏等。现在认为分泌的多少部分由指示剂的电荷所决定。例如, 钙绿的渗漏比 Fluo 3 少, 因为前者较后者多一个正电荷。

近年来, 许多抗渗漏的指示剂业已生产出来, 如 Fura PE3、Indo PE3 和 Fluo LR 等。有人将指示剂与不透膜的右旋糖酐或其他大分子物质共轭结合使其不能渗漏。还有一种积极的方法是在实验中连续用微型移液管添加指示剂, 以弥补渗漏所损失的量。

六、测量 Ca^{2+} 的技术

(一) 测量 Ca^{2+} 的光学技术

荧光显微镜允许在完整的活细胞中对功能分子的分布和动力学进行研究。尽管如此, 在细胞内效应发生的同时, 功能分子可能同时有浓度、分布及功能的改变。为分析细胞内效应的具体机制, 通常需要多元制分析, 没有这种分析, 有时很难确定被观察到的离子状态的变化, 这是一个特殊生物现象的起因或影响因素所致。除此, 一些 Ca^{2+} 指示剂的特性可被细胞内环境所影响, 如一些 Ca^{2+} 指示剂的 K_d 值可受 pH 的影响, 因此多元制分析对于确定是否改变了 $[Ca^{2+}]_i$ 测量的精确度很重要。以下是对一些仪器和常用工具的性能、用途的说明。

1. 多参数数字化显微镜 用该显微镜系统可允许单个活细胞被多个指示剂标记, 每种指示剂可反映其特定离子的变化。该系统包括: 一台装有差额干扰比较和光谱范围的倒置荧光显微镜, 一台效能高的 CCD (charged-coupled device, 电荷耦合元件) 照相机或其他型相机, 一台摄像机, 一台服务器 (带联想主板和处理器), 一台氙-汞灯和一台主机的控制系统。两个 8 位滤光片在电脑控制下旋转, 其作用是在激发光的传导通路上施加滤光作用。每个指示剂所对应的荧光影像可被收集和数字化储存, 最终在单个活细胞中对各种参数在空间和时间的分布进行影像分析和处理。

2. 激光扫描共聚焦显微镜 (LSCM) 常规非共聚焦显微镜在空间分析时通常被焦平面外的荧光所影响, 因为一般认为焦点平面是最高具对比的平面, 背景荧光降低了影像的对比和清晰度, 导致平面分析不佳, 因而被观察到的荧光可能来源于整个细胞厚度的总和, 特别是对于相对厚度较大的细胞, 这可能会导致测定结果的误差。分析多层细胞的样本时, 用大广角显微镜会因背景而受很大干扰。而使用 LSCM 可克服这个缺点, LSCM 通过移动扫描标本, 由定位在扫描焦距上的共焦点的小孔收集激发的荧光而形成影像。通过排除焦距外的荧光, LSCM 提供了高效的在垂直和水平面上的空间分析。换句话说, LSCM 可观察到薄而清楚的光学平面, 能提供 3D 空间的影像。理论上讲, 每个所能得到的图像像素的荧光强度显示了该处离子的精确浓度。LSCM 的最大局限是其激光波长缺乏变化以及缺乏对时域快速的分析。因为 LSCM 一般使用的光源是氩或氩氦激光, 激发波长的可用范围非常局限。最近一些紫外激发的

LSCM 已被研制出来, 其对时域的分析已被改进得更快。

3. 双光子激发激光扫描显微镜 (TPLSM) TPLSM 是一种新型显微镜, 但人们对双光子激发的概念并不陌生, 早在 1931 年它就被预言了, 但在以后的 30 多年中一直没有得到实验证实。双光子激发, 意味着一个可发荧光的物质可以同时被两个独立的光子激发。由于光波的能量与波长成反比, 如果波长加倍, 则能量减半。因此, 如果两个独立光子的长波同时激发荧光物质, 理论上实际激发强度与一半波长的单光子激发强度相同。长波激发的使用, 使光谱中紫外线范围激发的染料可被应用。此外, 长波刺激使影像受影响的程度和对细胞的毒性减小, 而且对细胞的穿透能力较强。

TPLSM 有与 LSCM 媲美的高空间分辨率。然而, 这种高分辨率的机制与 LSCM 的完全不同。因为两独立光子同时激发的可能性与光子密度的平方成正比, 所以用 TPLSM 不能使远离聚焦平面的荧光物被激发 (足够能量), 这就导致了较高的空间分辨率。而在 LSCM 上, 除了聚焦平面外, 聚焦平面周围也被激发, 只因小孔阻碍了从非聚焦平面到探测仪的辐射光。TPLSM 使激发限制于某一区域的特点使其发生脱色的程度远比 LSCM 小。而且 LSCM 用单光子激发有时会被背景或溶剂所影响。相对而言, TPLSM 不受这些因素干扰, 因为其激发波长比发光波长短上几百纳米, 而且在光谱上更分散。并且, TPLSM 一般不需要小孔设备, 而后者为 LSCM 保持其高空间分辨率所必需。当然, 若 TPLSM 使用小孔设备, 则会提供更好的空间分辨率即共焦 TPLSM。小孔设备的意义在于使用简单的光学通路达到增荧光探测功效的目的。

4. 电子脉冲激光显像系统 脉冲显像系统是由 Kinoshita 和他的同事发明, 并由 Fernandez 和他的合作者应用于测定兴奋-分泌耦联与兴奋-收缩耦联的快速 $[Ca^{2+}]$ 变化的研究中。在此系统中, 细胞被一个短暂 (300~350 ns) 的高强度脉冲激光瞬时激发。激发后引起的延迟脉冲性发光可被一主电脑系统处理。这种系统可进行对亚微粒空间和毫秒时域的分析。

以上介绍了常用的显微镜测定系统, 此外还有时间依赖性荧光显像显微镜 (TRFLM)、光电倍增管 (PMT)、流式细胞术 (flow cytometry) 等, 这些方法也有一定的优缺点, 在此就不赘述了。

(二) 非光学法测定 Ca^{2+} 的技术

1. 电生理学方法 测定钙依赖性的离子通道的电流可间接估计 $[Ca^{2+}]$ 的水平。如由 Ca^{2+} 激活的 Cl^- 通道所产生的电流可用来显示细胞内 Ca^{2+} 的变化, 也可用 Ca^{2+} 激活的其他非选择性阴离子通道和 Ca^{2+} 激活的 K^+ 通道来间接反映 $[Ca^{2+}]$ 的变化。但是, 用 Ca^{2+} 激活的离子通道的电流虽可估计细胞内 Ca^{2+} 的变化, 却不能测定细胞内 Ca^{2+} 的绝对值。

2. Ca^{2+} 选择性电极 Ca^{2+} 的含量能够通过 Ca^{2+} 选择性电极测量出来, Ca^{2+} 选择性电极有较荧光染料宽的作用范围, 方便于含 Ca^{2+} 液活体定标, 但离子选择性电极对自由离子改变的反应比荧光染料要慢。离子选择器是通过把复杂的离子结合物导入液态亲脂性的膜结构 (这种结构能鉴定自身的离子选择性) 而制得的。复杂的离子结合物能够从含水溶剂中选择性地提出离子, 并把他们运送通过亲脂性的膜结构, 从而产生了膜电位, 此电位的大小与离子的浓度差呈正比。一种未知离子浓度 (C) 和一种对照离子浓度 (C_y) 在假设没有其他离子干扰时的电位差, 可由如下 Nernst 方程式给出: $\Delta V = 28 \log (C/C_y)$ 。

七、测量 Ca^{2+} 的步骤及注意事项

(一) 细胞样本的准备

用急性分离所得的细胞或培养细胞均可。

(二) 指示剂的负载

一般用加样器取带少许细胞的原液放入试管中, 加入指示剂 (如 Fura 2-AM) 的终浓度为 1~5 mmol/L, 在 25℃ 的常温下孵育 30~35 min。离心并冲洗 3 遍, 以尽可能减少细胞外液中的背景污染。细胞的数量不能太多也不能太少, 足够当天的实验所需即可, 数量太多可浪费负载的指示剂的浓度, 数量少对完成实验不利 (在实验中寻找理想细胞的机会减少)。另外, 若数量过少, 细胞可能会发生染料中毒而影响细胞的功能。对一些培养贴壁的细胞 (如肿瘤细胞), 可在培养皿里直接负载指示剂, 并将培

养皿直接放在显微镜下进行测定。

(三) 荧光测定仪的使用

按仪器的使用规则有步骤地开机使用, 实验室应有技术人员协助。首先要调定激发的波长和指示剂的发光波长。如对于 Fura 2 来讲, 它适用于比值法测定的指示剂, 其所需的紫外激发的波长是 510 nm, 测定的是 340/380 nm 波长时的荧光比值。其次要测定细胞外液的背景荧光量, 再将显微镜的视野对准细胞进行测量, 实际所得的 340/380 nm 荧光比值应该是扣除了背景的荧光量, 该比值代表了细胞内的含钙量。扣除过程由有计算机的控制系统自动完成。340/380 nm 的荧光比值在静息状态下并不是一条直线而是一条频率高而波幅低的相对平整的曲线, 反映了细胞内钙在动态中的相对稳定, 该荧光比值曲线波幅一般应在 0.03 以下。如果波幅太大可能会影响测定效果, 一些小的荧光变化则可能被掩盖。波幅太大的原因多是细胞状态不好 (如细胞发生染料渗漏) 或指示剂负载欠佳。在处理一些尚能辨认出的结果时, 可用主机所携带的滤波功能将噪音去除。

(四) 定标

理论上讲, 每次实验完毕后都应对实验结果进行定标, 因为两次实验的负载情况并不一样。由于定标十分麻烦, 现在国际上都直接用荧光量或荧光比值来直接代表 $[Ca^{2+}]_i$ 的水平, 如用 340/380 nm 的荧光比值来反映心肌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 水平。

第九章 分泌作用的钙离子控制

第一节 细胞外分泌机制

许多细胞在囊泡内储存有生物活性物质，当囊泡和浆膜融合时能分泌这些物质，这种现象称为细胞外分泌。这些生物活性物质包括：神经递质等激素和杀微生物蛋白。另外，细胞外分泌和许多生物现象有关，如脑功能、代谢、激素调节和主动防御。在很多情况下，细胞外分泌是细胞受刺激的反应，并且受第二信使调节。1957年，Hodgkin 和 Keynes 认为 Ca^{2+} 内流至神经末梢可能在乙酰胆碱释放中起作用，1961年 Douglas 和 Rubin 证实 Ca^{2+} 是肾上腺髓质分泌的关键介质。自此人们研究了许多细胞的调节机制，揭示了许多分子方面的细节。然而，尽管在 Medline 上用关键词 calcium 和 secretion 能查到 18 000 篇以上的文献，但许多问题仍然未能得到解决。在讨论依赖 Ca^{2+} 分泌的研究方法之前，先总结一下囊泡与膜是如何融合（SNARE 假说）和 Ca^{2+} 进行调节的机制。

一、SNARE 假说

近年来，SNARE 假说在分泌研究中占主导地位，它提出了膜融合的通用机制（见图 9-1）。

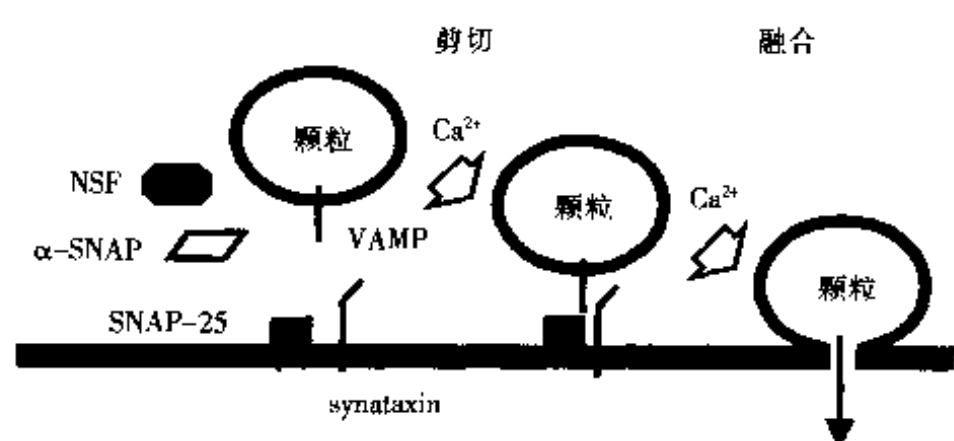


图 9-1 SNARE 假说模式图。NSF：N-乙基马来酰亚胺敏感因子；SNAP：可溶性 NSF 粘附蛋白，已知有 α 、 β 、 γ 三型；SNAP-25：25Kd 的突触体（synaptosome）相关蛋白；VAMP：囊泡相关膜蛋白。主要过程包括剪和融合两个阶段

虽然假说受到了许多重大的修改，但它的基本观点仍然得到了肯定。在囊泡和浆膜上的蛋白形成一个紧密的复合体，这些蛋白质包括 NSF（N-乙基马来酰亚胺敏感因子）和 SNAP（可溶性 NSF 粘附蛋白），因此被命名为 SNARE（SNAP 受体）。在囊泡上的 SNARE（v-SNARE）和在靶细胞膜上的 SNARE（t-SNARE）形成 SNARE 复合体。Synaptobrevins 或者 VAMP 可能形成 v-SNARE，而 syntaxin 和 SNAP-25 被认为是 t-SNARE 3，并形成 1:1:1 的 SNARE 复合体（VAMP:SNAP-25:syntaxin）。两种胞液蛋白 NSF 和 α -SNAP 在囊泡交通中是必不可少的，但其具体作用仍不明确。

许多证据认为它们分解 SNARE 复合体，在加速融合时重新排列 SNARE 蛋白。融解结晶结构的 SNARE 复合体能得到平行四螺旋结构，形成相对膜使彼此靠近，但仍然不清楚的是 SNARE 复合体本身能否加速膜融合。最近对酵母空泡的融合研究显示 SNARE 复合体在囊泡剪尾中起作用，并传信号至下游效应器来催化融合。SNARE 假说基本上适用于哺乳动物和酵母的调节和基本分泌。

二、 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} 粘结蛋白在调节分泌中的作用

Ca^{2+} 在许多细胞的细胞排粒触发中起重要作用。膜片钳分析显示突触分泌和 Ca^{2+} 的亲合力是 $190 \mu\text{mol/L}$ ，而内分泌细胞如胰腺 β -细胞有更高的亲合力（ $1.6 \mu\text{mol/L}$ ）。对中性白细胞膜片钳的研究显示过氧化物酶阳性颗粒的 Ca^{2+} 亲合力分泌与突触分泌相似，而过氧化物酶阴性颗粒的 Ca^{2+} 亲合力分泌与内

分泌细胞相似。这样，同样细胞的不同颗粒数量有不同的 Ca^{2+} 亲和力分泌，而分泌 Ca^{2+} 感受器的身份还没有确立。神经分泌中低亲和力 Ca^{2+} 感受器的最大可能者是 Synaptotagmin，它同样也在高亲和力分泌中起重要作用。其他 Ca^{2+} 分泌的候选者包括附加素、钙调蛋白和 S-100 蛋白。 Ca^{2+} 诱导分泌在兴奋和非兴奋细胞中高度协作，高亲和力分泌比低亲和力分泌显示更不明显的协作性，且协作行为的分子基础仍不清楚。细胞排粒作用可分为以下步骤：颗粒恢复-膜-剪短和融合，其中有几步是 Ca^{2+} 依赖性的。然而，大多数实验不能区分分泌的不同步骤，因此测定 Ca^{2+} 亲和力和协作性能反映许多分子的行为。

三、 Ca^{2+} 通道

亲和力、 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度是否能升高到所需水平是个主要的问题，假如可以的话，那么其关键机制是什么？一般认为这么高的 Ca^{2+} 浓度可能发生在电压门控的 Ca^{2+} 通道附近，因为 Ca^{2+} 在胞液中能达到快速缓冲，所以特别高的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度区非常小。局部 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度升高的大小和时间是分泌效果的关键。在一些情况下，分泌器能和通道直接反应以确保接近性。

粒细胞和其他非兴奋细胞并没有电压激动性 Ca^{2+} 通道。然而当钙储存空虚时，它们可以打开储存操纵性 Ca^{2+} 通道。而这些通道和电压门控 Ca^{2+} 通道在兴奋细胞的分泌中是否起同样的作用仍不清楚（图 9-2）。有人已经研究了粒细胞原始排粒中储存操纵型钙内流的作用。结果表明在这些细胞中，分泌很容易通过由 Ca^{2+} 或高浓度钙通过一个移液管膜片引起的微扩散来触发。然而，储存操纵性 Ca^{2+} 通道的作用是复杂的。钙内流对触发细胞排粒是必要的但不是充分的，而且需要协同信号。这将确保粒细胞分泌，而且只有几个刺激通道同时被激活时才对机体有害。 Ca^{2+} 诱导原始颗粒释放阈值可能比靠近储存操纵性 Ca^{2+} 通道的钙浓度高，这样协同信号可以增加 Ca^{2+} 亲和力分泌，而协同信号可能影响通道和分泌器间的距离。

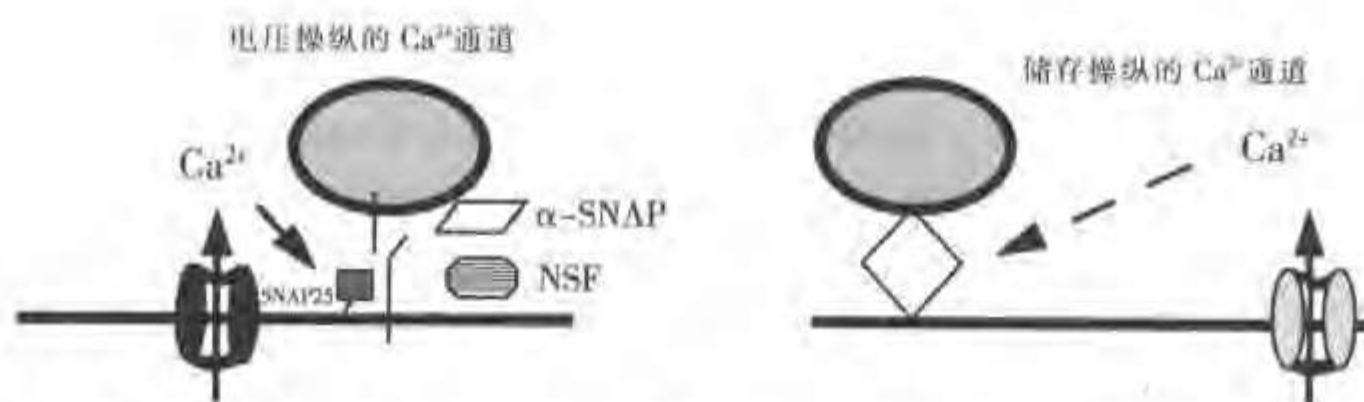


图 9-2 电压操纵的 Ca^{2+} 通道 (voltage operated Ca^{2+} channels, VOC) 和储存操纵的钙离子通道 (store operated Ca^{2+} channels, SOC) 在分泌调节中的作用。VOC 介导的分泌是由于 SNARE 复合物和局部 Ca^{2+} 作用引起。对于 SOC 介导的分泌，还有几个问题有待解决：这种激活是否也依赖于 SNARE 复合物？ Ca^{2+} 的作用是什么？局部 Ca^{2+} 浓度有多高？

四、胞内钙池

静电的内质网类型钙池用来解释从粒细胞分泌进入吞噬体（吞噬-溶酶体融合），粒细胞中的吞噬溶酶体融合是钙依赖性的以及钙储存到吞噬体空间再分布。在吞噬细胞发现吞噬溶酶体融合是钙依赖性的，在吞噬细胞存在不同的钙依赖融合机制。

五、钙依赖分泌

Ca^{2+} 对分泌的重要性是不容置疑的，如在低钙浓度时用 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 刺激中性粒细胞和嗜酸性细胞和胰腺 β 细胞就能分泌， $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 可能对分泌机制或对分泌的平行通道起作用。既然我们不知道 Ca^{2+} 是如何起作用的，也不知道哪个分子实际催化融合反应，那么 $\text{GTP}\gamma\text{S}$ 的潜在靶细胞也是模糊的。SNARE 假说和钙

分泌感受器研究已有很多综述,在此仅回顾钙分泌控制的方法,评估它们的优缺点,并结合实例来说明,实例主要来源于脊髓细胞的研究。许多方法还被运用于细胞生物学的其他问题,在本书的其他章节有相关叙述。

研究钙在分泌中的作用,三个元素是必不可少的:测定分泌的有效方法;胞液无钙浓度 ($[Ca^{2+}]$ 浓度)的操作技术; $[Ca^{2+}]$ 浓度的定量方法。三个元素相辅相成,下面将分别加以介绍。

第二节 研究分泌的方法

测量细胞排粒分泌的方法包括:在胞外介质测定分泌的颗粒含量(测量酶活性、低分子量物质放射标签、电化学分析等);在浆膜中插入颗粒膜蛋白如 f-MLP 受体上调、整合素上调;测定细胞颗粒含量损失;测定浆膜表面的细胞排粒诱导的增加量。

一、完整细胞、渗透细胞和无细胞系统

(一) 测量从完整细胞释放的颗粒含量

分泌试管分析为调节机制的基本需要提供更多的信息,包括它的钙依赖性等。细胞孵育在适合的缓冲液中,接着刺激其分泌,用快速冷却和离心的方法来停止细胞排粒,然后将细胞从分泌的物质中分离出来,后者的浓度从上清中测定,分泌物质量与未刺激控制细胞的总量有关。这样的实验在 96 孔板很容易大批量进行, 10^4 ~ 10^6 个细胞可确保消除细胞间变量,分泌的时间可分解为 3 s 间隔。为了快速实验,用一个相反的时间过程实验也很方便,分泌的最长时间条件首先刺激,最短的最后,用快速冷却同时停止。

(二) 局限性和问题

如果细胞是异种的,目的信号可能看不见,在瞬时转染实验里,仅有少量细胞表达目的基因,可以通过转染一个无双亲细胞或能直接进入分泌器的遗传标记来解决这个问题。这样发现了少量双转染细胞的分泌,所有细胞均含有目的基因。显然,如果目的细胞很难得到或不可能纯化,细胞群体研究就有一定局限性,需要单个细胞技术。细胞的酶释放测量也可用渗透细胞技术。

(三) 无细胞系统的测量

用海胆卵来进行这方面研究。准备包括皮质膜和数以千计排列在膜里面的皮质颗粒,仅需要 Ca^{2+} 去触发细胞排粒作用,而不需要胞液因素。通过前光散射的变化,用显微手段观察颗粒融合酵母遗传学主要用于研究酵母空泡融合,通过隔离空泡可以测定单个无细胞融合所需要的融和蛋白,酵母空泡含有较多融合时能相互作用的蛋白质。Weber 等报道了融合的完全重建,重组 SNARE-蛋白在囊泡间重建成独立的双层脂囊泡和脂混合物,因为囊泡的容积太小,不可能去证实这些脂混合物,因此完全融合还需要另外的蛋白质。

另一个无细胞分泌分析是基于胰腺细胞分解的浆膜和颗粒,颗粒用十八烷基罗丹明负载,在囊泡内获得高浓度通过自我冷却来诱导它的荧光,这个技术已经用来识别另一个潜在的钙分泌感受器 syncollin。

二、单个细胞

缺乏细胞是不能研究单个细胞的一个原因。单个细胞揭示许多在群体研究中很模糊的特征,它们能用更高的时间分辨率来研究。有时单个细胞技术变成单个颗粒技术来研究个体颗粒融合,主要有 4 种技术来研究单个细胞的分泌实验:电容、电流分析法、荧光和全内反射显微镜技术。

(一) 电容

用膜片钳技术进行的电容测量已经揭示出分泌机制的许多细节。生物膜作为电容器,电容与膜表面

积成比例 ($10 \text{ fF}/\mu\text{m}^2$), 浆膜和颗粒膜融合导致膜电容增加, 而且增加值是可以测量的。这项技术用于很多类细胞, 它的时间分辨率是在毫秒范围内。电容测量有两种方法: 一是电容脉冲, 用于记录细胞典型获能电流, 用指数脉冲发生程序来分析, 这种时域 (time-domain) 法是强烈的, 适合大电容变化的检测; 二是应用正弦变化电压记录正弦电流反应, 并用相敏感探测器来分析, 可用软件或硬件锁定 (lock-in) 放大器来完成。与时域技术相比, 该“锁定”技术具有更好的时间分辨率和放大率, 因此目前得到广泛应用。只要细胞形态单一且浆膜可以通过电流, 电容测量就可用于任何分泌细胞。然而, 由于轴突几何形态复杂, 人们不能记录神经细胞的有意义电容变化, 因此要用神经末梢来替代, 记录突触后电流作为突触神经递质分泌时的生物探测器。

在许多类细胞中, 单个颗粒融合由于电容逐步增加是可以测量的。在膜片钳技术中的全细胞模型中, 梯级可小至 2 fF , 已经可分辨出中性粒细胞约 280 nm 直径的囊泡。然而, 中性粒细胞有几种类型的颗粒, 它们中有一些仍不能探测到。对应于 60 nm 囊泡的细胞粘附构型测定极限可小至 0.1 fF , 甚至突触囊泡用细胞粘附电容技术也可以测量出。

(二) 电流分析法

近年来, 电流分析法和电压测量是测量单个细胞分泌的强有力工具。用这项技术, 少量氧化或还原物质在分泌细胞附近均可测量, 氧化还原反应具有特征性氧化还原动作电位。这项技术对儿茶酚胺和 5-羟色胺释放特别敏感, 它的明显优点是不侵入细胞。另一方面, 不是所有分泌细胞释放的物质用这项技术都可测量出来。酶转化可以产生次级产品, 如葡萄糖和乙酰胆碱。

(三) 荧光

亲脂染料在细胞膜环境变成强荧光, 而在体液里几乎无荧光。在细胞排液过程中, 新的膜暴露到细胞外液, 更多的荧光进入细胞膜, 导致总荧光增加。群体巨噬细胞的细胞排粒受染料 TMA-DPH 监视, 单个巨噬细胞 TMP-DHP 荧光升高慢于膜电容的升高。所以染料侵入到细胞膜是不同时的, 荧光并没有随着电容直线升高。

近来, 一种改进的新染料 (FM1-43) 用于细胞排粒和细胞摄粒研究, 当其进入细胞膜时, 它的荧光亮度增加了 350 倍, 染料在数十秒内从膜上排除, 而内在的膜仍然染色, 为摄粒囊泡提供一个活染色。FM1-43 和其他一些染料是可见的, 在联合成像技术中, 这些染料提供细胞排粒和摄粒的空间信息。电流分析法和 TM-染料常用来联合膜片钳电容记录。但有两个潜在问题: 一是细胞排粒和细胞摄粒对电容有相反作用, 两者如果同时发生, 电容反应只能反应两者之间的净平衡; 二是一些电容活动可能与分泌活动无关, 可通过联合测量分泌的方法来解决这个问题。

(四) 全内反射显微镜技术

颗粒用荧光染料如何进行负载, 可通过染料从负载细胞的损失来测定分泌, 这个技术主要与全内反射显微镜技术 (TIRM) 或消散波显微镜技术联合应用。在粘附细胞的玻片底层附近, 它照亮一个 100 nm 的薄层, 亮度 (消散野) 从玻片界面逐渐衰退, 这样越靠近膜的物体亮度越亮, 任何超过这个薄层的物体均看不见。和共聚焦显微镜相比, 它的分辨率 (沿着 x 轴) 是相当强大的, TIRM 用荧光点来跟踪个体颗粒, 当荧光点临近嗜铬细胞时, 颗粒亮度变成到膜的距离。当颗粒和膜融合时, 因为染料被分泌到细胞外, 所以荧光就消失, 亚膜 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度也可用 TIRM 来测量。联合 Ca^{2+} 和颗粒跟踪可以达到在 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度升高或分泌位置间的空间排列活体图像。

第三节 分泌过程中胞内 Ca^{2+} 测定

一、完整细胞

(一) 钙内流测定

评价 Ca^{2+} 在分泌中作用的最简单方法是把 Ca^{2+} 从细胞外介质中清除出去, 在大多数情况下, 这将停止或减少分泌。依赖于实验条件, 延长细胞外 Ca^{2+} 缺乏的时间可改变细胞内 Ca^{2+} 的稳态, 如使细胞内 Ca^{2+} 储存排空。例如当人中性粒细胞与无 EGTA 的 Ca^{2+} 含有 EDTA 的介质孵育时, 在 20 min 内附着的中性粒细胞将丢失很大一部分储存钙; 小牛肾小球对细胞外 Ca^{2+} 螯合反应可造成 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度的快速下降。

胞外 Ca^{2+} 对分泌的影响反映出 Ca^{2+} 通道的重要性, 在可兴奋性细胞, 去极化引起电压依赖 Ca^{2+} 通道的开放。随后胞外介质的钙内流触发了分泌, 而通过升高细胞外钾浓度可产生去极化, 因为对大多数细胞来说, 膜电位由细胞内外钾浓度决定。

非兴奋细胞没有电压激动型 Ca^{2+} 通道, 它们主要的钙通路是受体或储存操纵型 Ca^{2+} 通道。储存操纵型 Ca^{2+} 通道的开放机制尚不明确。任何排空胞内钙储存的过程将导致储存操纵通道开放。钙储存池的充填依赖 SERCA 型 Ca^{2+} -ATP 酶, 其可被几种药物抑制如 thapsigargin、cyclopiazonic acid 等。因为钙储存池具有渗漏性, 因此 Ca^{2+} -ATP 酶抑制将导致 Ca^{2+} 的丢失并引起储存操纵型 Ca^{2+} 通道开放。这些通道可被三价阳离子 (如 La^{3+} 、 Gd^{3+}) 和咪唑衍生物抑制。因而分泌过程中储存操纵的钙内流作用的研究可获得许多药理学工具。对于粒细胞, SERCA 泵的抑制能最大程度激活储存操纵钙内流。这个通道与趋化肽 fMLP 受体介导的活化是无法区分的, fMLP 可刺激 Ca^{2+} 从胞内储存释放, 随后引起储存操纵的 Ca^{2+} 内流。储存操纵型 Ca^{2+} 通道抑制剂可强烈降低 fMLP 诱导的分泌作用。借助于理阿诺碱 thapsigargin, 可将 fMLP 对细胞 Ca^{2+} 稳态的影响与 fMLP 对诱导分泌的影响分开。在无钙介质中, 用理阿诺碱处理 HL-60 细胞能激起 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度瞬时的增加, 主要是由于胞内钙储存的释放, $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度在 5 min 内恢复到基础水平。储存操纵钙内流仅是 HL-60 的细胞排粒的弱激动剂, fMLP 触发剂突触信号通道对强烈分泌反应是必不可少的, 但这些研究需要在同一条件下的酶释放和相当的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度。

(二) 离子载体

离子载体广泛用于增加 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度, 最常用的是 ionomycin 和 A23187, 后者是荧光剂, 可以用 4-溴-A23187 替代。饱和剂浸入到不同的细胞膜上, 作为钙氢离子交换器, 在某些细胞中, ionomycin 对细胞内钙储存膜有明显的倾向性。此外, 它还作为钙通路直接穿过浆膜。用 $1 \mu\text{mol/L}$ 浓度联合 $0\sim 5 \text{ mmol/L}$ 细胞外 Ca^{2+} 能使 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度从 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 升高到超过 $10 \mu\text{mol/L}$ 。用此方法, 建立了中性粒细胞的钙剂量反应曲线。既然 ionomycin 的膜亲和力依赖于脂成分, 所以不同的脂类可能吸引不同的离子饱和剂。当钙内流穿过膜时将被局限并引起亚细胞范围内的高钙。 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度的均值不能充分反映局限化的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度峰值。例如 HL-60 细胞的钙刺激胞外排粒, 用 ionomycin 处理的 HL-60 能引起 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度均值同样升高, 但只用 ionomycin 能刺激胞外排粒 (图 9-3)。而最可能的解释是 ionomycin 在 Ca^{2+} 活动位置导致非常高的钙浓度, 它还能直接浸入浆膜。总之, 当用 ionomycin 测定时, 分泌的 Ca^{2+} 亲和力可能估计过高。

(三) 膜渗透性钙缓冲液

把钙螯合剂导入细胞是抑制 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度升

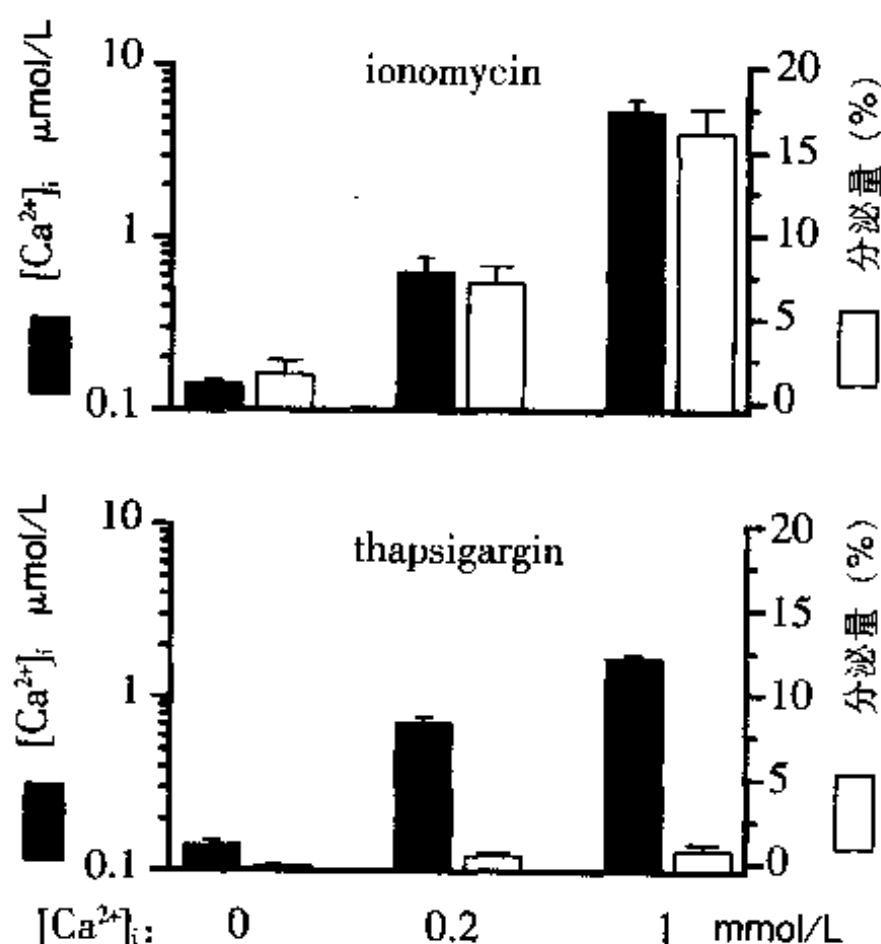


图 9-3 ionomycin 和 thapsigargin 诱导的 Ca^{2+} 浓度升高和分泌的差别。HL-60 细胞悬浮在无钙离子的介质用 50 nmol/L thapsigargin 或 0.5 mmol/L ionomycin 处理, 加入 0 、 0.2 或 $1 \mu\text{mol/L}$ CaCl_2 。用 fura-2 和 β -氨基葡萄糖苷酶 (glucosaminidase) 的分泌来测定 Ca^{2+} 浓度的升高, 在同一条件下测量。在 ionomycin 和 thapsigargin 诱导 Ca^{2+} 浓度同样升高时, 只有 ionomycin 可有效刺激分泌

高和降低稳态 $[Ca^{2+}]$ 浓度的便利方法。最早期的钙荧光指示剂消光系数低, 因此只能用于高 Ca^{2+} 浓度。研究者很快意识到这是一个影响 $[Ca^{2+}]$ 浓度的方法, 并可同时测量 Ca^{2+} 浓度。最近螯合剂膜通透酯衍生物 BAPTA 和 MAPT 用于细胞内钙缓冲, 常与更有效的染料 Fura-2 和 Indo-1 联合应用。钙螯合剂酯负载过程依赖于和负载荧光染料一样的参数: 介质中的酯浓度、膜渗透性、孵育时间、温度、细胞的酯酶活性以及使螯合剂和染料从细胞排除的阴离子转运剂。而螯合剂是存在于胞质液还是膜包成分必须确定。通过仔细控制上述条件, 可避免螯合剂存留于包膜成分。例如螯合剂可能通过细胞摄粒吸收, 降低温度将减弱细胞摄粒作用并避免分检作用 (sequestration)。另一方面, 酯酶是温度依赖性的, 因此室温负载可能是一个不错的方法。 $[Ca^{2+}]$ 浓度有效缓冲的最肯定的方法是同时钙测量。通过以上的方法来升高 $[Ca^{2+}]$ 浓度和缓冲 $[Ca^{2+}]$ 浓度都是替代技术。有的可测定 Ca^{2+} 对于分泌是否足够, 而有的可确定 Ca^{2+} 对于分泌是否需要。

二、渗透细胞和无细胞系统

(一) 细胞渗透性

测量完整细胞 $[Ca^{2+}]$ 浓度的所有技术都面临亚细胞范围内的高 $[Ca^{2+}]$ 浓度问题。可用渗透细胞获得对 $[Ca^{2+}]$ 浓度更直接的控制。这里仅讨论与分泌最相关的问题, 用链球菌溶血素 O 或洋地黄皂甙能充分地快速控制胞液成分。链球菌溶血素 O 在含胆固醇的膜上能形成大于 10 nm 大孔, 以至于尿素酶的蛋白质 (分子量 483 kDa) 均能通过此孔, 这样就无法与磷酸甘油激酶 (分子量 45 kDa) 和乳酸脱氢酶 (分子量 140 kDa) 区分。许多可溶性胞液蛋白在 5~10 min 漏出细胞, 离子和离子螯合剂进入细胞甚至更快。在低微摩尔范围内, 链球菌溶血素 O 引起的细胞渗透几乎不受 Ca^{2+} 影响, 但毫摩尔浓度的钙能抑制膜孔的形成。胞液蛋白的损失将导致与这些蛋白有关的功能丧失。在细胞渗透的数分钟内, 对促分泌的反应明显减弱, 这是该技术的缺点。另一方面, 重建实验能识别对分泌非常重要的几种蛋白质的身份。而且, 分泌减弱的速度可能依赖于 Ca^{2+} 浓度, 因此可揭示分泌作用 Ca^{2+} 依赖的粘附机制。

(二) Ca^{2+} 缓冲液

用渗透细胞研究依赖 Ca^{2+} 的分泌, 介质的 Ca^{2+} 浓度必须准确地控制, 在几百 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下, 用 Ca^{2+} 缓冲液可以达到。EGTA 和 BAPTA 是最常用的 Ca^{2+} 缓冲液。两种螯合剂对 Ca^{2+} 比对 Mg^{2+} 有更高的敏感性。超过 1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度, 常用 HEDTA 螯合剂 (K_d 为 6 $\mu\text{mol/L}$), 若浓度再高, 常用枸橼酸盐 (K_d 为 470 $\mu\text{mol/L}$), ATP 对分泌是非常重要的, 因此常常加在渗透液里。ATP 也是 Ca^{2+} 和镁离子的螯合剂, 同时也是 Ca^{2+} 缓冲液的制剂。因此 Ca^{2+} 缓冲液含有两种螯合剂 EGTA 和 ATP 及两种阳离子—— Ca^{2+} 和 Mg^{2+} , 其他离子常被忽略。然而血清蛋白如 BSA 能携带大量的 Ca^{2+} 到溶液里, EGTA 和 ATP 就释放质子去结合 Ca^{2+} , 这样 Ca^{2+} 缓冲液就和 pH 相联系。考虑以上所有因素来制备无钙的 Ca^{2+} 缓冲液。常常使用计算机计算离子浓度, 作为离子螯合剂、pH、温度、离子强度、总浓度的函数。MaxChelator 和 WinMaxc 程序广泛用于这样的计算 (<http://www.stanford.edu/cpatton/maxc.html>)。这个程序的特点是可以进行 2D 和 3D 计算, 它是估计潜在偏差如温度变化的很好工具。当制备一系列不同无钙浓度 Ca^{2+} 缓冲液时, 最好同时从 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 和所有螯合剂的普通储存液准备所有的缓冲液。要更准确就需制备 EGTA 和 EGTA 饱和的 Ca^{2+} 缓冲液, 按不同的比率混合得到一系列 Ca^{2+} 缓冲液。最终 Ca^{2+} 缓冲液的钙浓度可以用 Ca^{2+} 电极或者荧光 Ca^{2+} 指示剂来监控。然而两种方法都有局限性, 因为它们依赖于溶液的成分和它们现成的合适标准。

(三) 膜片钳技术

完整细胞结构的膜片钳技术是: 从移液管直接进入胞液, 同时在胞内和胞外维持非对称性。细胞排粒的电容测量可以一个毫秒的时间分辨率用于观察单个颗粒的融合。理论和实验观察显示扩散的时间常数和进入的抵抗力成正比。Pusch 和 Neher 基于进入抵抗力、细胞电容、扩散因数得出了扩散时间常数的计算公式。然而这公式仅给出了估计和测量的扩散时间, 有严重的偏差。在膜片钳细胞的扩散要慢于

链球菌溶血素 O 渗透的细胞。每个链球菌溶血素 O 孔比膜片移液管开口要小，但似乎每个细胞都有很多孔（图 9-4）。

扩散时间对实验的时程很重要，一般希望当 Ca^{2+} 缓冲液扩散达到稳态时去刺激细胞，此时，细胞内 Ca^{2+} 浓度接近于吸管内 Ca^{2+} 的浓度。而当 Ca^{2+} 缓冲液本身是刺激剂时，分泌结果的时程依赖于 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度升高的时程和分泌的固有结束时间（inherent time constraints）。在移液管的 Ca^{2+} 浓度越高，细胞的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度升高越快。在几类细胞中， Ca^{2+} 诱导的分泌已达到分泌的最大速率，即使再提高移液管中 Ca^{2+} 的浓度，也不能提高细胞分泌的速率。

因为一个细胞不只是一个装满水的囊腔，因此根据移液管溶液的成分和扩散性质来预测 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度变化的过程是相当困难的，细胞的 Ca^{2+} 缓冲、储存、泵和通道均能影响 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度变化的速率。只有测量 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度才能揭示细胞内的真正变化。在扩散控制过程中，可以反指数曲线方式在数分钟内达到移液管内的钙浓度 $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{吸管}}$ 。人中性粒细胞用 10~600 $\mu\text{mol/L}$ 的灌注液灌注，将导致 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度 S 形升高（图 9-5）。

在无钙浓度中，更高的缓冲液浓度将加速 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度的变化，因为缓冲液是 Ca^{2+} 开闭器。因此常使用 5~10 mmol/L Ca^{2+} 螯合剂。然而 Ca^{2+} 螯合剂可能引起副作用，例如 1 nmol/L BAPTA 能抑制 IP_3 及其受体。为缓冲粒细胞 NADPH-氧化酶释放的质子，使用 50 mmol/L HEPES，然而仍可测到 pH 值变化。

Ca^{2+} 通道引起的快速钙内流能短暂克服胞内缓冲能力，BAPTA 的 Ca^{2+} 连接反应比 EGTA 快，BAPTA 更适合通过通道缓冲钙内流和抑制局部高 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度。常用这个特点去测定钙源和效应器分子间的接近性。如果用 BAPTA 而不是 EGTA 缓冲来抑制细胞排粒，那么钙源和效应器分子必定相互靠近。

膜片钳穿透的细胞用 Ca^{2+} 缓冲液灌注，确保 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度保持在同一水平。除非 Ca^{2+} 通道开放， $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度将和移液管溶液钙水平相同或稍低。在中性粒细胞，缓冲液的灌注技术使分泌不依赖于胞外钙（图 9-6）。不幸的是，缓冲灌注技术导致 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度的缓慢变化，而许多实验需要快速变化。常用笼锁的化合物取得这样的变化，钙螯合剂衍生物的缓冲特点可以通过光裂来改变。钙高亲和力的笼锁化合物通过移液管灌注至细胞内，达到平衡。UV 灯闪烁劈开笼锁的化学结合键，螯合剂的钙亲和力急剧下降，释放结合钙至细胞，用这个技术可以达到在毫秒内几百个微摩尔的 Ca^{2+} 变化，这是研究神经和内分泌细胞

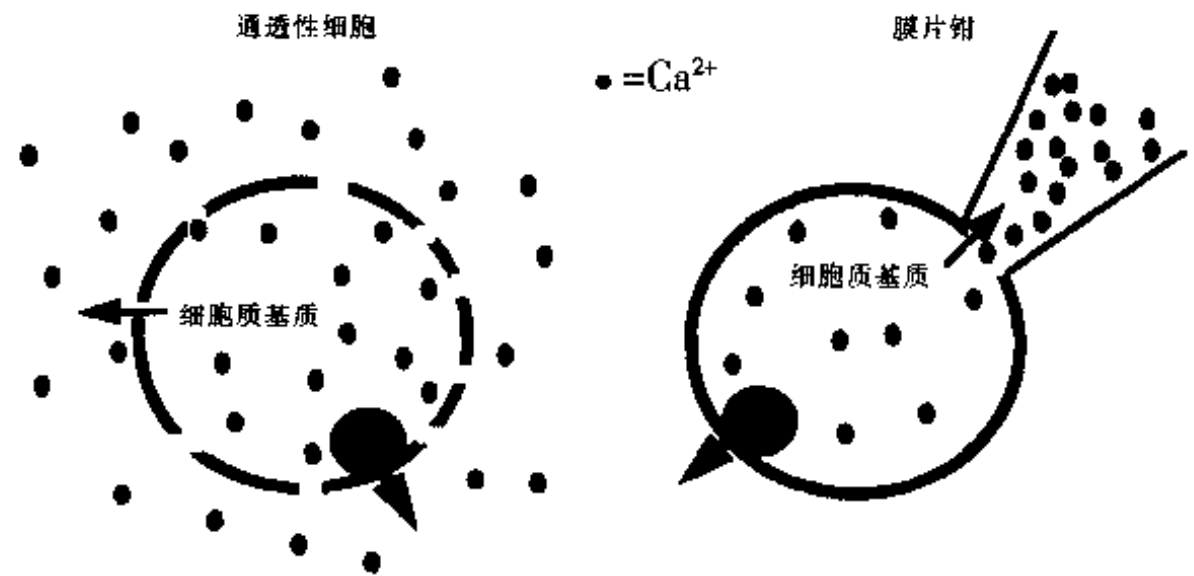


图 9-4 渗透性细胞和完整细胞膜片钳技术比较 渗透性细胞在整个细胞表面都有孔，胞质液可快速与外部介质平衡。在完整细胞膜片钳技术中，只有一个大孔联系胞质液和吸管内液体，可获得细胞外和细胞内溶液的生理不对称性，在实验中可单独改变细胞外溶液

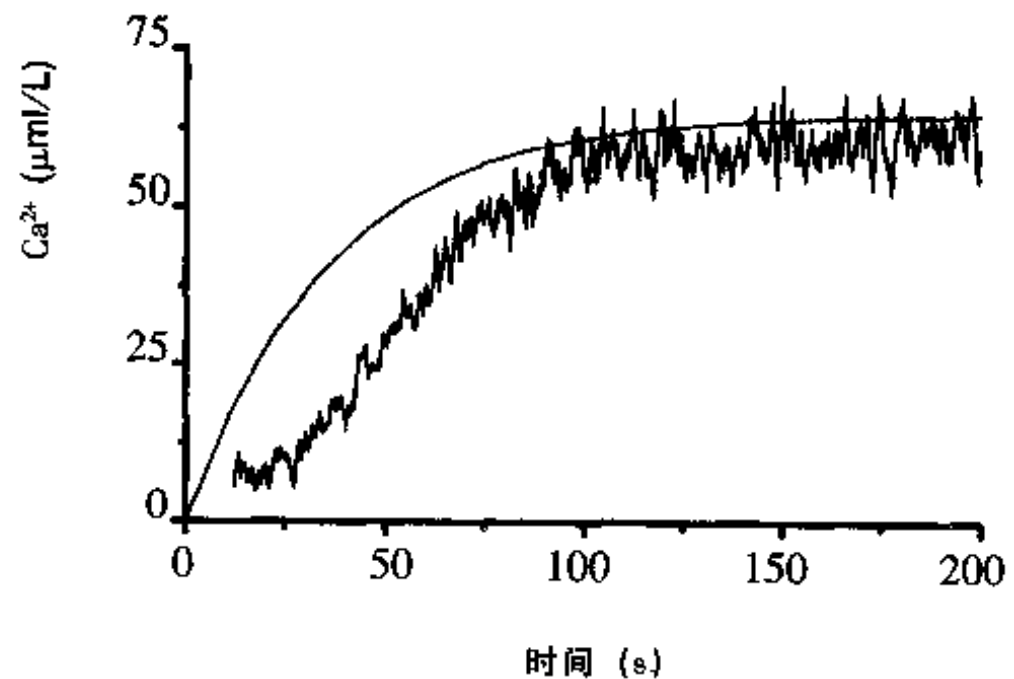


图 9-5 Ca^{2+} 缓冲液灌注的人中性粒细胞 Ca^{2+} 浓度的升高低于扩散控制过程的预期值。对于扩散控制过程， Ca^{2+} 浓度将为一种反指数曲线（平滑线）。用 Indo-1 FF 测量显示 Ca^{2+} 浓度呈 S 形升高，提示在它们的缓冲能力被克服之前，可通过细胞作用将 Ca^{2+} 浓度在低水平保持一段时间

快速分泌的理想方法。笼锁钙通过改变了化学行为的钙缓冲液来传送入细胞，最常用的笼锁钙螯合剂 DMNP-EDTA 对镁离子亲和力是微摩尔级。如果 Ca^{2+} 结合的 DMNP-EDTA 进入细胞，它将碰到毫摩尔级镁离子， Mg^{2+} 将从 DMNP-EDTA 取代一部分钙，并引起 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度短暂增加。新的 NP-EGTA 对 Mg^{2+} 亲和力低，但它的钙亲和力是 80 nmol/L （而 DMNP-EGTA 仅为 5 nmol/L ），这意味着化合物只有 50% 是生理 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度的结合钙。无

钙 NP-EGTA 作为钙缓冲液并结合一些光解释放的钙，当闪烁聚焦在细胞去获得最大释放时， Ca^{2+} 将从细胞扩散至移液管，未剪开的化合物将进入细胞内并缓冲钙。这样 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度在闪烁后立即上升至最大值，接着缓慢下降。对分泌来说，在 1 s 内发生不是问题，对缓慢和长时间持续 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度将不恒定，依赖于闪光的调节， $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度可以恢复到基线水平，从同样基线重复钙升高的效果，就可以用重复的闪烁分析。

笼锁钙是研究快速细胞排粒和摄粒及低亲和力钙依赖分泌和分泌最后步骤分解的有力工具。

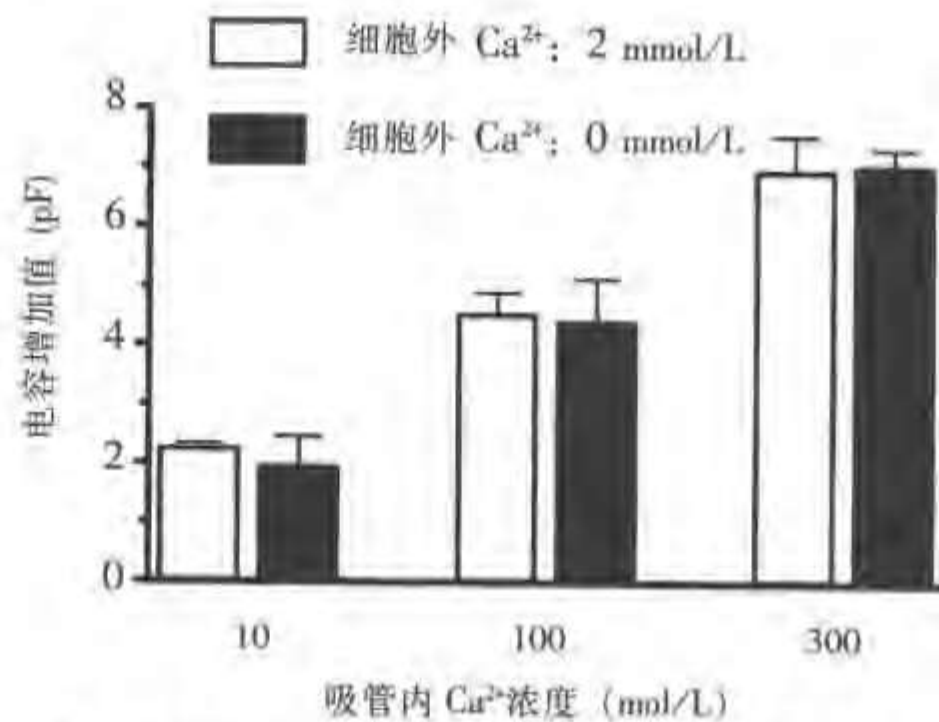


图 9-6 缓冲液灌注的中性粒细胞的排粒作用不依赖于细胞外 Ca^{2+} 。图示存在 (□) 或缺乏 (■) 细胞外 Ca^{2+} 的条件下，用含有 10、100 或 $300 \mu\text{mol/L}$ 游离 Ca^{2+} 的 HEDTA 或枸橼酸缓冲液灌注，中性粒细胞电容 (capacitance) 的增加

第四节 分泌时胞内钙测量

Ca^{2+} 在分泌通路中作用的最初介绍来源于 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度细胞排粒的平行测量，这样的观察可以显示出 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度和细胞排粒是否相关，而且能在群体细胞中独立地在同样的实验条件下测量两种反应。显微技术可测量 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度并可在平行实验中测定其分泌，通常用膜片钳电容记录法和使用钙荧光指示剂完成。

一、平均 Ca^{2+} 浓度

(一) 荧光染料

Fura-2 是最广泛的钙荧光指示剂，它和 Indo-1 的优点之一是能进行比率测量，这样钙测量变得不依赖染料浓度，减少了众多的人为现象。其他几种染料也有一定的运用，但这些染料大多数无荧光，当膜通透酯被胞内酯酶裂解后形成不透膜的荧光产物，如果染料偶然积聚在细胞器，在显微镜下可看见颗粒荧光染色，此时应改进负载过程直到产生均匀染色为止。Indo-1 和 Fura-2 对 Ca^{2+} 亲和力约 200 nmol/L ，几微摩尔 Ca^{2+} 浓度就可达到饱和。既然一些分泌机制决定于更高的 Ca^{2+} 浓度，因此就需要低亲和力的钙指示剂，目前有很多低亲和力 Ca^{2+} 指示剂成品（如 mag-fura-2 即 furaptra，mag-fura-5，钙橙-5N），其中仅有一些可以进行比率测量。由于 Fura-2 和 Indo-1 对 Ca^{2+} 比 Mg^{2+} 有更高的选择性，因此在新的染料 Fura-2FF 和 Findo-1FF 里得以保留，这些染料可对 $10\sim 100$ 微摩尔范围内的 Ca^{2+} 进行比率测量。

(二) 单细胞钙荧光指示剂

将钙荧光指示剂的比率测量技术和膜片钳技术结合起来需要特殊的技术。Indo-1 可在 305 nm 单一波长激发，发射波长可在 405 nm 和 480 nm 记录，这需要发射光通路有两个光电倍增管和一个分光器 (beamsplitter)。Fura-2 可用 $340/380 \text{ nm}$ 或 $360/390 \text{ nm}$ 波长激发，其发射波长可使用 505 nm 光电倍增管

记录, 这需要两个 UV 灯 (带有一个转换镜) 或一个 UV 灯 (带一个滤过器轮或一个单色镜加一个转换镜), 这样就可两种激发波长之间快速切换。另外还需要与激发系统配套的采集系统, 确保各自激发波长产生的发射光被分开。而且转换系统要具有机械稳定性, 避免产生膜片-移液管-细胞相互反应而产生紊乱, 通常是通过将转换系统 (轮或镜) 经过一种可弯曲的光导向装置与显微镜相连接而达到的。

显微镜荧光记录需要高的光强, 这样光漂白可能是个问题。在膜片钳细胞, 漂白受损由移液管溶液的染料库来补充, 染料的 UV 光激发对细胞有副作用。其原因是: ①UV 光的直接损害; ②染料的发射光损害; ③光漂白形成的毒性分解产物。例如用 Fura 负载荷兰猪嗜酸性粒细胞的细胞排粒作用, 因为 UV 照射而受到抑制, 同样的条件对中性粒细胞的细胞排粒作用无影响。降低光强度, 嗜酸性粒细胞的钙测量变得可行, 虽然信噪比低, 但对细胞排粒没有影响。

二、限定亚细胞区域的 Ca^{2+} 浓度

研究需要钙的分泌的重点是 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度亚细胞分布的重要性。Fura-2 常平均分布在细胞质, 细胞质里的 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度少许变化将被平均 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度相对稳定性遮蔽。既然钙分泌的决定步骤是靠近浆膜或在 Ca^{2+} 通道附近, 所以有必要测量亚膜 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度。有几个研究组用钙指示剂去测量近膜区的 Ca^{2+} 。

当钙荧光指示剂广泛应用取得很大成功时, 仍然有一些限制, 特别是低空间选择性。近年发光蛋白和荧光钙结合蛋白克服了部分缺点。发光蛋白水母素 (aequorin) 和新的基于绿荧光蛋白的 *cameleon* 已经应用。这些蛋白的基因被转染至细胞, 应用这些 Ca^{2+} 探针使许多分子生物学操作均可实现, 如融合蛋白构建、基因的亚细胞打靶、改变 Ca^{2+} 结合性质的突变及其他蛋白质的共表达等。水母素和 SNAP-25 的嵌合体被靶定到细胞膜的内层, 这个研究对研究分泌有很大的作用。phogrin-水母素融合蛋白已经用来测定分泌胰岛素的 MIN6 和嗜铬细胞瘤 PC12 细胞分泌时, 分泌颗粒范围的 Ca^{2+} 浓度。这项研究没法确定在颗粒附近的高 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度及储存在颗粒内 Ca^{2+} 的作用。

第十章 细胞亚组分的分离和细胞内钙库研究

细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的改变是活细胞的基本特征。通过 Ca^{2+} 信号的传递能启动和调节细胞的很多重要功能，包括受精过程，细胞的分裂、增殖和分化，肌肉收缩，腺体细胞的分泌以及细胞的死亡过程。细胞内 Ca^{2+} 的正常浓度为 100 nmol/L ，胞内的 Ca^{2+} 库连同质膜和线粒体对维持这一浓度起着重要的作用。当细胞被激活时， Ca^{2+} 从 Ca^{2+} 库释放。钙池的结构中有三种蛋白：①钙池中 Ca^{2+} 的摄取与 thapsigargin 敏感的肌浆网/内质网 Ca^{2+} -ATP 酶家族 (sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase, SERCA) 有关，在钙储池腔内大部分与 Ca^{2+} -结合蛋白结合 (Ca^{2+} -binding protein, CaBP)；②在 1, 4, 5-三磷酸肌醇受体 (IP_3R) 或利阿诺定 (ryanodine) 受体 (RyR) 家族激活细胞内 Ca^{2+} 通道时，积聚的 Ca^{2+} 从钙储池释放入细胞质。这种钙的释放形成复杂的空间-时间模式，而又受特异性细胞内蛋白的调节，如各种激酶、磷酸酯酶、肌丝蛋白等。

尽管钙库在 Ca^{2+} 信号的产生和传递过程中起着重要的作用，但它的结构在许多细胞中还是未知的。不过，在骨骼肌和心肌细胞中，我们已知 Ca^{2+} 库存在于内质网 (ER) 和肌浆网 (SR) 上，它参与了 Ca^{2+} 的摄取、隔离和释放。一般认为肌细胞和非肌细胞的 Ca^{2+} 库完全或部分地与内质网重叠。其实，钙库与内质网的关系远不止这么简单，这是因为：第一，不同细胞的内质网的结构不同，不同阶段内质网的功能也不同；其次，钙库的分子构成也是变化的，确实，钙库的三个主要功能中，每个都与两三个蛋白有关，而且，SERCA、 IP_3R 和 RyR 又有不同的亚型；第三， Ca^{2+} 不只储存于内质网，还包括其他的一些细胞器。

Ca^{2+} 库的性质和它在细胞中的位置关系着钙信号的特性，因此获知 Ca^{2+} 库在不同细胞中所处的位置，并得到它的图像数据就显得尤为重要。要达到这一目的，有两个方法：①免疫细胞学方法观察钙库的关键成分；②进行亚细胞组分分离生化分析。有人曾用这两种方法，通过不同的观测手段，观察不同种类的细胞，获得了不同程度的成功。在免疫细胞学实验中，借助荧光指示剂和标记方法，已经在荧光显微镜下以及电子显微镜下，观测到 Ca^{2+} 库关键成分的细胞内定位。但这种方法的不足之处是不能分析出钙库的分子结构，而且在蛋白质浓度较低时检测不到 Ca^{2+} 库的存在。

理论上比较好的一种方法是采用细胞裂解技术分离 Ca^{2+} 库，再对其进行生化分析，这里我们介绍的就是这一技术和使用结果。从以下结果可以看出，细胞的种类不同，甚至是同一细胞在不同阶段， Ca^{2+} 库的性质都会发生变化。由于篇幅有限，这里我们主要讨论的是细胞裂解技术，同时我们也收集了相关技术的一些资料，感兴趣的读者可参照其他的综述以获得更多的关于 Ca^{2+} 库的信息。

第一节 非肌细胞

一、 Ca^{2+} 库的位置

有证据证明在非肌细胞 Ca^{2+} 库与 ER 完全或部分地重叠。ER 是非肌细胞中的一个较大的细胞器，它又可分为滑面内质网、粗面内质网及核膜。这种分类方法有助于理解蛋白质的合成和分解过程，但对描述它对 Ca^{2+} 传递的作用是远远不够的。此外，ER 腔中的 Ca^{2+} 具有多种重要功能， Ca^{2+} 库中的 Ca^{2+} 能被迅速地释放到胞质中，同时它对 ER 的结构和蛋白质的合成也起重要的作用。

虽然 ER 的结构具有连续性, 但通过电子能量损失光谱检查, 对全部腔内 Ca^{2+} 含量进行高分辨率作图, 观察到 Ca^{2+} 库中 Ca^{2+} 的分布是不均匀的。腔内 Ca^{2+} 的梯度与连续的结构一致, 提示 Ca^{2+} 库中的 CaBP 的分布是不均匀的。 Ca^{2+} 库上分布着许多 CaBP 钙网硬蛋白, 但关于它的分布研究却较少。在星形细胞和少突胶质细胞中, Ca^{2+} 库中钙结合蛋白较多 (尤其是 IP_3R_2) 的地方, 与钙波出现的地方距离很近。功能实验还显示 ER 在空间上和功能上都存在 Ca^{2+} 池。 Ca^{2+} 库在 ER 中的位置可能与先前命名的钙小体 (calciosomes) 有着共性, 而且通常成像技术观察到这一位置是能产生钙火花的区域。

此外, ER 同 Ca^{2+} 库一样都处于动态变化之中。在卵母细胞的成熟过程中, 就发生了 ER 结构的改变, 而这一改变与 IP_3R_1 的再分布有关。在中性粒细胞的噬菌过程中, Ca^{2+} 库的结构也发生了迅速的重组, 但我们还没有搞清发生这一改变的机制。最近的研究证实了 ER 和核膜结构的连续性, 同时也发现 Ca^{2+} 的浓度持续升高时, 这种结构的连续性被破坏。有人观察到在 RBL-2H3 细胞中, 当胞浆中的 Ca^{2+} 浓度水平中等时, IP_3R_2 重新分布并形成聚集; 当 Ca^{2+} 浓度高时, ER 发生小泡化。而在中性粒细胞, Ca^{2+} 库的再分布引起了 Ca^{2+} 浓度的升高。

用 IP_3R_1 的抗体研究了非肌细胞中激动剂敏感的 Ca^{2+} 库的位置。电子显微镜观察到在各种细胞中都分布着高密度的 IP_3R , 在普肯耶神经细胞中, IP_3R 的密度最高 (约 3×10^8 个受体/细胞), IP_3R_1 主要分布在滑面内质网上, 并呈重叠状。少量的 IP_3R_1 分布在粗面内质网和核膜上, 但在质膜、线粒体或高尔基体上没有 IP_3R_1 的存在。大部分鸡小脑的普肯耶细胞中, 也同样存在着利阿诺啉受体 (RyR)、SERCA 泵和 CaBP 贮钙素。使用电子显微镜和免疫荧光显微镜技术在其他类型的神经细胞、卵细胞和卵母细胞及其他细胞中也证实了 IP_3R 存在于 ER 的说法。有人报道使用 IP_3R 不同亚型的抗体可观察到各种亚型的 IP_3R 在细胞器上的分布。

也有一些实验证实, 在高尔基体、溶酶体和其他的分泌小泡上, 同样存在着 Ca^{2+} 库, 不过这一说法的证据还不完善, 尤其在一些分泌小泡上还存在着争论。关于以上的结论大都来自功能性实验, 还没有免疫细胞化学的证据。然而有一个特例是精母细胞, 它不含 ER。哺乳动物的精母细胞 IP_3R_1 存在于精子膜上, 而海胆精母细胞的 IP_3R_1 存在于质膜周围。不过在这些细胞器上存在的是否是真正的 Ca^{2+} 库还需进一步的工作来证实, 因为我们知道在细胞分裂过程中这些细胞器的修复位置与 ER 上 Ca^{2+} 库的位置大致相同。还有一个问题是, 对一些细胞中 Ca^{2+} 库的分析是建立在 IP_3R 和 IP_3R 相关的蛋白是存在于质膜这一假说之上的。但这种蛋白的功能还是未知。

核膜与 ER 相连而且在核膜的延伸部分存在着 IP_3R 。因此, 我们常把核膜认为是 Ca^{2+} 库, 已知 Ca^{2+} 库具有调节核孔开放的功能, 而且 IP_3R 也存在于核膜的内膜。但核膜的 Ca^{2+} 浓度是如何调节的尚为研究的热点。

线粒体对 Ca^{2+} 信号的传递也起着重要的作用。以往认为, 在胞内 Ca^{2+} 超载时, 线粒体可起到一种缓冲作用。最近有实验证实, 线粒体以一种 Ca^{2+} 依赖方式促 Ca^{2+} 释放而起到对胞内 Ca^{2+} 信号的调节作用。值得注意的是, 与 Ca^{2+} 释放有关的线粒体与 ER 存在着时空性的联系。对以上观点感兴趣的读者可参阅近期文献。

二、 Ca^{2+} 库的纯化技术

(一) 细胞的来源

分离的器官和组织是细胞的最早来源。过去, 肝组织是用于细胞分裂研究中的常用组织。在非肌细胞中 (肌细胞参照第二节), 肝、脑和胰腺常用于 Ca^{2+} 库的研究, 但这样获得的细胞不够纯。因此另外一种方法就是进行原代培养细胞或使用细胞株。尽管细胞株比较昂贵, 而且它与最新分离的细胞有一些差别, 但它能够满足细胞需求量较大的要求。目前, 细胞系已成功地应用于一些研究中。

(二) 分离技术中的常见问题

在过去的二三十年中, 通过细胞分裂技术获得较为纯化的细胞器已被广泛地应用。一般说来, 通过

组织匀浆破碎细胞,再经过一系列的差速离心和梯度离心可获得纯化的细胞器。这种方法的建立应同时兼顾细胞的纯度和收率。细胞的裂解技术曾应用于对 ER 的定性研究和对 ER 与质膜上的 Ca^{2+} 转运蛋白的比较性研究中,这里就不再讨论 ER 在 Ca^{2+} 调节过程中的作用。这里着重讨论的是与 Ca^{2+} 调节和 Ca^{2+} 库有关的 ER 的性质和分离技术,本章主要介绍的是组织匀浆和离心技术。

1. 组织匀浆 大多数实验中均采用轻微的匀浆法,这样不至于破坏细胞器的结构,比如核、线粒体、分泌小体和高尔基体等。质膜和 ER 被损伤后可修复成一个闭合的囊泡,这一囊泡可作为 Ca^{2+} 摄取和释放的研究对象。这里介绍了几种匀浆器,分别适用于不同的细胞和不同的研究目的。这些匀浆器包括玻璃匀浆器(Dounce 氏)、玻璃-特氟龙匀浆器(Potter-Elvehjem)和金属匀浆器。比较粗糙的方法包括固定角匀浆(Polytron)和超声破碎,这两种方法会破坏细胞的蛋白质,使用中应避免持续的处理。有实验证实,培养肾细胞膜上的囊泡对 Ca^{2+} 的摄取活性与匀浆条件有关。以上介绍的所有的匀浆器在使用中都会产热,因此冰浴尤为重要。对于少量的悬浮细胞,还可以采用氮气穴爆破法,这种方法就是向容器中通入液氮,然后迅速减压,并对细胞进行冷却,在膨胀阶段细胞间形成的气泡炸开了细胞。

培养细胞的匀浆要比组织匀浆困难,这是因为组织中富含细胞支架,有助于聚集的细胞器的修复。有意思的是在肝组织 Ca^{2+} 库上 IP_3 敏感部分与质膜共同移动。将 Ca^{2+} 库从质膜上分离下来的方法是冷冻后用细胞松弛素 B 或碱处理,这也表明细胞中的微丝具有固定 Ca^{2+} 库的作用。为提高匀浆效率,我们常使用低渗液,不过低渗介质对细胞器也有破坏作用。在匀浆介质中加入混合型的蛋白酶抑制剂能够防止蛋白降解,蛋白酶抑制剂包括对苯甲磺酰氟(PMSF)、苯甲脒(benzamidine)、抑肽酶(抑制亮氨酸蛋白酶)、亮肽素(抑制亮氨酸和疏醇蛋白酶)、抑肽素(抑制酸性蛋白酶)和 EDTA(抑制金属蛋白酶)。注意,当使用胰酶消化细胞时,需终止酶的活性后再进行下一步的反应。

2. 差速离心法 差速离心法可对各类膜进行初步的分离。在这一过程中,颗粒按体积大小形成团状。当离心力最小时,最大的颗粒沉淀;相反,当离心力最大时,最小的颗粒沉淀。这样就可依次获得核、线粒体、质膜和内质网。然而,通过这种方法获得的膜成分不够纯。为避免一种膜成分夹杂在另一种膜成分中,可在每一步离心时选用合适的缓冲液洗涤,这样差速离心法获得的含 ER 的部分将成为微粒体。这种方法获得的膜成分混杂的主要原因是膜颗粒的大小变化范围较大(如微粒体的大小是 10~350 nm),另外,还有一些细胞器体积相似如高尔基体和内体。

3. 密度梯度离心 经过差速离心法后获得的微粒体部分,再通过密度梯度离心进一步纯化。分离的介质一般由两三种物质组成,从而形成连续的或非连续的密度梯度。含蔗糖的介质常用于 Ca^{2+} 库的分离,它的缺点是当浓度大时粘度和渗透性也增加。Percoll 是一种含有 20~30 nm 大小颗粒的硅石胶态悬浮液,因为粘性小和对渗透压无影响而被广泛地应用于密度梯度离心,它也被应用于 Ca^{2+} 库的分离。因为 Percoll 密度梯度在离心过程中形成,因此应严格控制离心的时间和速度。

密度梯度离心包括两种方法:等密度离心和带状离心。在等密度离心过程中,膜微粒的分离与它们自身的密度有关,因此分离介质的密度梯度要根据微粒的密度选定。在离心过程中,每个微粒都移动,直到它所到达的介质的密度等于它自身的密度。然而,不同的膜成分也可能具有相同的密度。对于带状离心,分离介质起一个支撑作用,膜样品平铺在分离介质的表面。当离心时,膜颗粒根据它们的密度和体积沉淀。当所有的颗粒到达离心管的底部时,停止离心。带状离心虽然很少用,但在分离密度接近的各部分时就显示了它的优势,因为它可根据它们沉淀速度的不同进行分离。在分离密度相近的膜成分时,我们也可人为地改变它们的密度。例如在分离质膜时,可将质膜与洋地黄皂甙共同孵育,质膜中富含的胆固醇能与洋地黄皂甙结合,从而提高了 ER 的密度。这种方法也应用于 HL-60 细胞系 Ca^{2+} 库的纯化。

4. 免疫沉淀法 选择膜成分的特异性抗体可对其进行纯化。对肝组织进行超声分离后,选择 IP_3R_1 特异性抗体进行免疫沉淀,可成功地将其分离。这可能是由于 ER 被肌丝蛋白包裹的原因。不过,除 IP_3R_1 外免疫沉淀法还不能用于分离其他的蛋白质,这表明 IP_3R_1 并未与 ER 上其他的蛋白分开或 ER 上其他的蛋白含量较小,不能用于免疫分离。

(三) Ca^{2+} 库分析技术

对 Ca^{2+} 库的分析可采用两种方法,而且这两种方法相互渗透,一种方法是根据已知的细胞器的结构对 Ca^{2+} 库进行研究;另一种方法是研究参与 Ca^{2+} 处理过程的不同蛋白质的共存。

1. 与已确定的标志物的关系 在这一方法中, Ca^{2+} 库的蛋白与一些蛋白相关,这些蛋白能作为某些细胞器的标志物,但它们并不参与 Ca^{2+} 信号的传递。需要注意的是 BiP、PDI 曾作为 ER 的标志物,现有实验证实它们也参与 Ca^{2+} 的处理。表 10-1 列出了最近用于 Ca^{2+} 库研究的标志蛋白,更多的信息请读者参考其他的手册。

表 10-1 非肌细胞分离得到的细胞内钙库片段的分析标志物

标志物	备注
A. 内质网标志物 (涉及 Ca^{2+} 结合的蛋白质已经排除)	
NAD(P)H 氧化还原酶	鱼藤酮不敏感的活性据认为是 ER 的标志物。
葡萄糖-6-磷酸酶	分布有局限性 (肝、肾)
甘露糖-6-磷酸酶	定位于腔内
Sulphatase C	
RNA	粗面 ER
Ribophorin	粗面 ER
层连蛋白 (lamin)	核膜
B. 质膜标志物	
腺苷酸环化酶	肝: 血窦膜
5'-核苷酸酶	肝: 胆小管膜
	极性细胞: 顶部细胞膜
	很难在细胞培养物应用
碱性磷酸酶	极性细胞: 顶部细胞膜
亮氨酸氨基肽酶	极性细胞: 顶部细胞膜
γ -谷氨酰转移酶	
Na^+/K^+ -ATP 酶	肝: 胆小管膜
	极性细胞: 基底侧面细胞膜
	很难在细胞培养物应用
质膜 Ca^{2+} 泵	
C. 线粒体标志物	
细胞色素 c 氧化酶	内膜
	第一动力学定律
琥珀酸脱氢酶	内膜
	在培养细胞低水平表达
D. 高尔基复合体标志物	
半乳糖苷转移酶	
α -甘露糖苷酶	
唾液酸 2, 6-转移酶	
TGN38	反式高尔基复合体 (trans-Golgi)
P58	ER 和顺式高尔基复合体 (cis-Golgi, 胰腺)

该表未包括颗粒标志物,因为它们具有细胞类型特异性

2. 细胞内 Ca^{2+} 调节蛋白之间的关系 第二种方法就是分析参与细胞内 Ca^{2+} 信号调节的不同蛋白质之间的定位和表达水平之间的关系。这种方法主要研究细胞内不同类型钙通道的关系、不同的钙通道与

SERCA 泵的关系、不同的钙通道与 CaBP 的关系、不同的 SERCA 泵与 CaBP 的关系、或以上任何两者之间的关系。从理论上说,通过以上分析,就可获知某一特定细胞中 Ca^{2+} 库的功能和性质。

3. 定量分析 大多数的标志蛋白可根据它们的酶活性对其进行定量分析。以每毫克蛋白的活性(比活性)进行不同膜成分间的比较。任何片段的比活性与匀浆的比率称为富集系数(enrichment factor),可用于测定分离组分的纯度。最大的富集系数与细胞中该细胞器的含量有关。例如若 ER 占膜成分的 10% (通过电子显微镜估计),那么与粗提物相比,纯化的 ER 表示蛋白的富集系数就是 10。这一数值可与其他富集系数相比,如 IP_3R 或 RyR 与配体的结合力以及 SERCA 泵对 Ca^{2+} 的摄取率或 ATP 酶活性。

当我们把酶作为标志物时,那么必须保证纯化过程不能影响到酶的活性。理论上,每一部分的酶活性都能够计算出来,其中一个有效的方法就是通过 De Duve-曲线图,其中浓缩因素与相关蛋白的关系呈倒数关系;另一种方法就是免疫杂交法,这种方法不但用于参与 Ca^{2+} 传递的蛋白质,也可用于一些标识蛋白。免疫杂交法不但受酶失活的影响,而且它还可区分蛋白的不同亚型。对免疫标记的蛋白的定量可采用密度计量法、磷酸化显相技术或荧光显色,同时对浓缩因素也可进行计算。需要注意的是必须保证测量值包含在线形范围内。另外,各种定量方法所得到的值都会有一些细微的差别,表明任何定量方法的使用都有其困难性和局限性。

(四) 实验示例

以上提到的方法应既能保证得到纯化的 Ca^{2+} 库,又能保证用于随后的定量分析。其困难性就是对所有的参数进行优化,因为细胞的种类不同,所使用的指标也不一样。在本章列举几个实例讨论 Ca^{2+} 库的纯化和分析技术。图 10-1~图 10-3 是实验过程,这几个例子包括不同的细胞类型(HL-60、人脊髓细胞、PC12 鼠嗜铬细胞瘤细胞、RBL-2H3 鼠粘膜肥大细胞),每一个细胞所表达的 IP_3R 亚型都不同。过去,曾对这些细胞中的 Ca^{2+} 传递作过详细的研究,同时这些资料也可对其他细胞中亚组分的分离提供一定的帮助。

1. HL-60 细胞中 Ca^{2+} 库的分离 图 10-1 说明了脊髓 HL-60 细胞中 Ca^{2+} 库的纯化过程。这里提供的方法可对 Ca^{2+} 库进行不同程度的纯化,并且在分离储存 Ca^{2+} 的细胞器时,提出了一个概念即 calciosome。尽管 calciosome 的概念用于细胞器的区分已不常用了,但它仍被认为是 ER 上一个高度分化的小体,并参与了 Ca^{2+} 信号的传递。首先用液氮气破细胞法破碎细胞。经第一步离心除去胞核,将上清液与洋地黄皂甙共同孵育以提高质膜的密度,然后以 Percoll 为介质进行密度梯度离心。将 Percoll 去除后,这部分膜成分与 IP_3 的亲合力很高,再用密度为非连续性的蔗糖进行进一步纯化(图 10-1)。经过这一步,所获得的膜成分富含 IP_3R_1 (26 \times) 和钙网硬蛋白 (27 \times)。同时实验显示 SERCA2b 也以同样的方式分布。ER 的标识蛋白的含量比 IP_3R_1 低,这表明 IP_3 敏感的 Ca^{2+} 库只有一部分存在于 ER。而且,这一研究也显示在脊髓 HL-60 细胞中一些对 Ca^{2+} 传递有着重要功能的蛋白共同存在着,但这种方式并不一定普遍存在。经纯化得到的膜成分并未进行 IP_3R 或 SERCA、CaBP 其他亚型的检测,因此还不清楚 Calciosome 与其他蛋白之间的关系。不过要进行更深入的研究,需对膜成分进一步纯化,随之带来的问题就是蛋白量的相应减少。

2. PC12 细胞中 Ca^{2+} 库的分离 图 10-2 和 10-3 显示的是对 Ca^{2+} 库中共同存在的

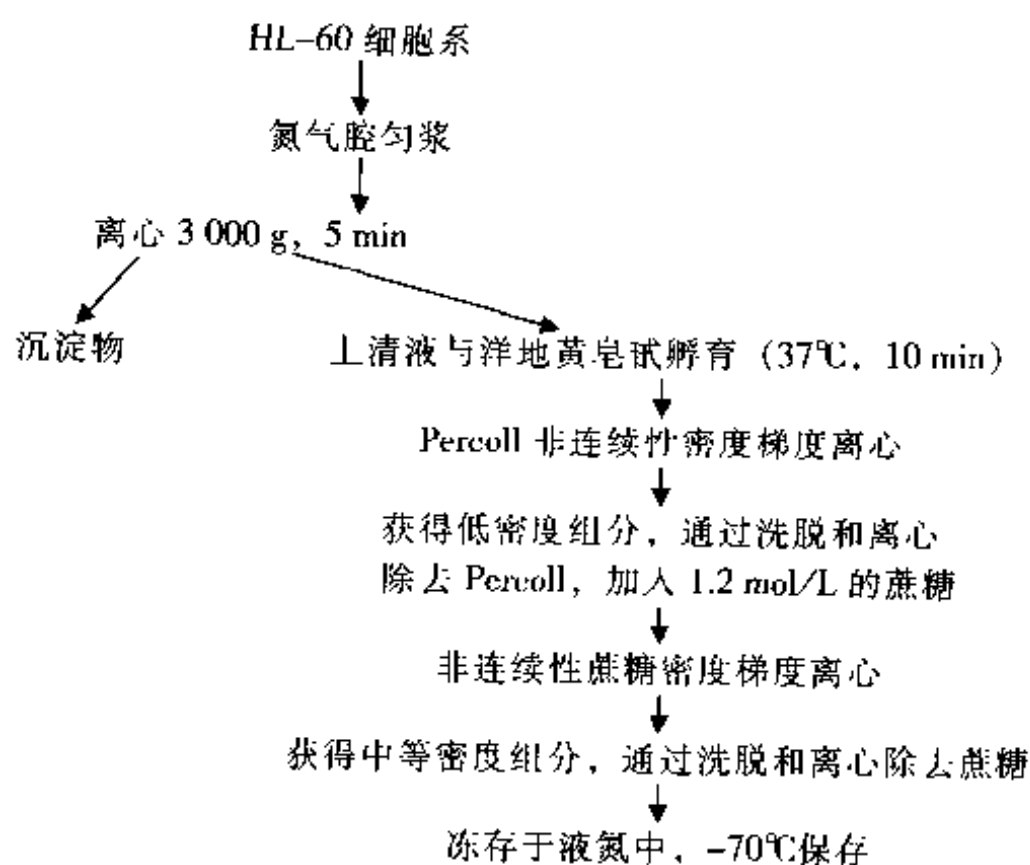


图 10-1 在人脊髓 HL-60 细胞中分离 calciosomes 的流程图

同工酶,对 F3 重悬后以 35 000 g 离心对其进一步纯化。在纯化物上与 IP_3 结合的蛋白的含量高于 ER 标识蛋白的含量,这也进一步说明了 Ca^{2+} 传递与 ER 的功能这两个概念并不等同。另外,在 F3 上并不含粗面内质网的标识 RNA。通过蔗糖的非连续性密度梯度离心将 F3 进一步分离。与 PC12 细胞中得到的结果相似,在 RBL-2H3 细胞中也得到了 Ca^{2+} 释放机制与 CaBP 和 Ca^{2+} 摄取机制有部分不同步的结论。有趣的是,有人还观察到 IP_3R_1 、 IP_3R_2 、SERCA2b、SERCA3、BiP 及钙网硬蛋白的互相迁移。

这些实验结果说明了 Ca^{2+} 库的一般性质:一方面以一种共同定位的方式出现,另一方面也说明了不同细胞的 ER 的结构也是不同的,这一问题将在以后的章节详细讨论。

三、 Ca^{2+} 库的性质

前面我们提过, Ca^{2+} 库的功能包括 Ca^{2+} 摄取、 Ca^{2+} 结合和 Ca^{2+} 释放。 Ca^{2+} 库上不同功能的蛋白按其功能分布在 ER 上,组成了一些专一的功能区。另外有些调节蛋白也与 Ca^{2+} 库有关。

(一) SERCA 系

Ca^{2+} 库对 Ca^{2+} 的摄取受 Ca^{2+} 泵的调节, Ca^{2+} 泵即 SERCA 家族,现已发现它有两三个亚型。在肌细胞和非肌细胞中 SERCA2b 高表达,而在血小板、淋巴细胞、肥大细胞、动脉上皮细胞及中枢普肯耶细胞中 SERCA3 高表达。

尽管在一些细胞中 SERCA2b 和 SERCA3 共同表达,但有人用免疫细胞化学法观察到在血小板中 SERCA2b 和 SERCA3 分布的位置有着严格的区分。最近的一个免疫定位研究表明,在胰腺细胞和涎腺细胞中不同亚型的 SERCA 的分布呈两极化。

在不同种类的细胞中还研究了各种亚型的 SERCA 和 IP_3R 共同分布的现象。在骨髓瘤细胞中, SERCA2b 和 IP_3R_1 共同存在。在大脑和胰腺的微粒体中 SERCA2b 和 IP_3R_1 的分布并不完全重叠。对 PC12 和 RBL-2H3 细胞的研究,揭示了 SERCA2b 与 SERCA3 同 IP_3R 分布的共同性,不过在 PC12, IP_3R_1 分布更加广泛。RBL-2H3 细胞中 SERCA2b 和 SERCA3 与 ER 的 Ca^{2+} 储存蛋白钙网硬蛋白及 BiP 的分布位置相同或相近,而在 PC12 细胞, SERCA2b 和 SERCA3 同钙网硬蛋白完全或部分地分离。

(二) 钙结合蛋白 (CaBP)

当 Ca^{2+} 被泵入到 Ca^{2+} 库中,一些高容量、亲和力低的 CaBP 就将 Ca^{2+} 隔离。一方面, Ca^{2+} 库中的 Ca^{2+} 能够从 Ca^{2+} 库中迅速地释放,同时它也对 ER 上的一些酶和蛋白(包括 IP_3R 和 RyR)起调节作用。非肌细胞 Ca^{2+} 库中的 CaBP 包括钙网硬蛋白、PDI、BiP、calnexin、Erp72 和 GRP94。这些蛋白都具有 Ca^{2+} 结合和伴随功能。在小脑, CaBP 还包括肌钙蛋白。CaBP 除了与钙具有结合能力外,它的功能还包括维持 ER 的 Ca^{2+} 浓度梯度及将 Ca^{2+} 定位于钙释放位点。

钙网硬蛋白被认为是非肌细胞中主要的 Ca^{2+} 储存蛋白,不过关于它的功能还有几个问题不清楚。这一蛋白同时具有 Ca^{2+} 高亲和力和低亲和力位点,钙网硬蛋白在细胞中的位置尚有争论。在一些研究中发现,该蛋白在 ER 中的分布是不均匀的,而在另一些细胞中它又与 IP_3R 和(或) SERCA 共同分布。钙网硬蛋白与 SERCA2b 共同分布的说法,符合最近观察到的钙网硬蛋白与 SERCA2b 在功能上相互作用的说法。它们的相互作用降低了 SERCA2b 对 Ca^{2+} 的转运能力,这也解释了另一种现象,即在爪蟾卵母细胞中,当钙网硬蛋白过表达时, Ca^{2+} 波呈衰减态。另外,钙网硬蛋白对 IP_3R 的功能也有直接的调节功能。

通过细胞亚组分的分析和免疫细胞化学法显示, ER 上 BiP 的分布是分散的。最近的研究表明, BiP 作为 Ca^{2+} 库中的储存蛋白约占其储存能力的 25%。

细胞亚组分的分析法显示 PDI 是 ER 中广泛分布的钙结合蛋白,最近研究表明,海胆卵蛋白、ER calreticulin/PDI 都具有 Ca^{2+} 储存的功能。Calreticulin 和 PDI 的联系使得对 PDI 的定位更加复杂化。现在还没有关于作为 CaBP 的 Calnexin 以及 Erp72 和 GRP94 能够储存钙的资料。

(三) Ca^{2+} -释放通道

细胞受到刺激后,内质网释放 Ca^{2+} 进入胞浆,内质网上的钙通道至少有两种: IP_3R 和 RyR。至少有

三种不同的基因编码与不同亚型的 IP_3 受体有关。大多数的细胞至少存在 IP_3 受体的一种亚型, 它由同源四聚体组成。几乎所有的细胞中都存在 IP_3R_1 , 而 IP_3R_2 和 IP_3R_3 只在少数细胞中有表达。我们还不清楚离体状态下 IP_3 受体的三种亚型的功能是否相同, 不过已有实验表明在体时, 这三种亚型对 IP_3 的亲合力不同, 而且 Ca^{2+} 和核苷酸的调节的参数不同, 其氧化还原活性也不同。

近几年来, 人们采用免疫组织化学法观察到 IP_3R 的两个以上的亚型。在炎性细胞、气管的纤毛细胞及血小板中, 不同的细胞器上分布有 IP_3R 的不同亚型。在鼠的卵细胞, IP_3R_2 仅在分离的细胞岛表达, 而 IP_3R_1 则分布于全部细胞。在 RINm5F 胰岛素瘤细胞和 AtT20 垂体细胞中有 IP_3R_1 和 IP_3R_3 共表达, 但据推测这可能与异四聚体 (heterotetramer) 的形成有关。在其他类型的细胞中, IP_3R 的分布呈现两极化。例如在大鼠肾细胞, IP_3R_1 和 IP_3R_2 主要分布在胞浆, 而 IP_3R_3 则分布在基底外侧。有人曾对外分泌的胰腺及下颌腺体中 IP_3R 和 RyR 进行过研究, 结果显示 IP_3R 和 RyR 的分布方式也不同, 这一结论与先前的功能实验得出的数据相似。

通过细胞亚组分的分离实验证实, 在 RBL-2H3 细胞中 IP_3R_1 和 IP_3R_2 是共同分布的, IP_3R_3 的分布位置与它们略有不同。另外, 通过与 ER 标识蛋白的比较显示, IP_3 敏感的 Ca^{2+} 库一般分布在粗面内质网上。在 RBL-2H3 细胞中, 通过免疫细胞化学法只对 IP_3R_2 进行了定量检测, 而且证实 IP_3R_2 同 BiP 一样存在于 ER 和核膜。这些结果说明了 IP_3R_2 与一些参与 Ca^{2+} 传递的蛋白 (包括 BiP 和钙网硬蛋白) 存在的位置相同。有趣的是, RBL-2H3 细胞中 IP_3R_2 在细胞器上的位置是可变的。例如在静息状态时, IP_3R_2 是分散的, 但当细胞受到刺激后, IP_3R_2 就以大范围的聚集态存在着。对 RINm5F 和 AtT20 进行免疫荧光染色, 结果显示 IP_3R 呈点状分布, 这种分布方式与 BiP 不同。

对脊髓细胞、肝细胞或小脑细胞进行亚组分分离, 研究证实 IP_3R 与 ER 的标识蛋白的分布在一定程度上无相关性。在 PC12 细胞, IP_3R_1 与钙网硬蛋白和 PDI 的分布方式也不同, 这些结果同先前的假设相似, 即 IP_3R 所构成的特殊的膜区存在于 ER 的腔内, 并与 ER 的其他部分相连。

关于 RyR 的三种亚型的基因编码已经被识别: RyR₁ 主要存在于骨骼肌和中枢的浦肯野细胞, RyR₂ 存在于心肌和大脑, 最近才发现的 RyR₃ 似乎分布在大脑和平滑肌上。我们也清楚地看到用于 RyR₁ 的 mRNA 编码的模式也适用于 RyR₁ 和 RyR₂。然而, 除中枢系统外, 并未检测到三种亚型的 RyR 的 mRNA 的广泛分布, 也可能是在非肌细胞中 mRNA 的表达水平太低的缘故。不过, 至今还未有四聚体形成的实验数据。

大多数细胞都同时存在着 RyR 和 IP_3R , 关于二者功能之间的联系一直是研究的热点, 也有人在研究细胞上 IP_3 -敏感的和 ryanodine-敏感的钙池的结构和功能是分开的还是重叠的。

关于这方面的研究, 脑组织比较多。在中枢的普肯野细胞 IP_3R 和 RyR 的分布是不均匀的。在整个细胞都存在 IP_3R 和 RyR, 但在中心处只存在 IP_3R ; 在海马的细胞体和枝状体都有 IP_3R 和 RyR 的存在, 但在中心处只存在 RyR。同样地, 通过细胞分裂技术获得的小脑和大脑的微粒体中, IP_3R 和 RyR 的分布也是不均匀的。在小脑, SERCA 与钙网硬蛋白的分布模式相同, 而贮钙素与 RyR 共同存在, 对脑组织不同区域分离的突触体研究表明 RyR 的分布是分开的。这一结论与前面的功能实验吻合。然而, 最近有人对普肯野细胞的研究中发现, 当耗竭 ryanodine-敏感的钙池后, IP_3 -敏感的钙池不再释放 Ca^{2+} , 表明所有的具备 IP_3R 功能的 Ca^{2+} 库也同时具备 RyR 的功能。但我们并不排除分离出只含有 RyRs 的 Ca^{2+} 库的可能性。另一方面, 使用培养的星型细胞, 我们可以观察到从 IP_3 敏感的 Ca^{2+} 池释放的 Ca^{2+} 波, 与从 ryanodine-敏感的 Ca^{2+} 池释放的 Ca^{2+} 波是完全分开的, 最后需要指出的是, 在非脑组织, 如肝组织也观察到 RyR 和 IP_3R 的分离。

(四) 与 Ca^{2+} 库有关的其他蛋白质

有人报道还有其他几种蛋白质与 Ca^{2+} 库有关, 而且关于与 Ca^{2+} 释放通道有关蛋白的报道也越来越多。这里我们只介绍几个与 Ca^{2+} 传递有关的蛋白, 这些蛋白在细胞中的位置也已清楚。FK506-结合蛋白 (FKBP12) 被认为是 Ca^{2+} 释放通道的一个亚单位, 因为它能与 RyR₁ 和 IP_3R_1 相互作用, 因此 FK506-结合

蛋白能够调节这两种通道的性质。

最近, 在 Jurkat T 细胞中发现, Ca^{2+} 调节环孢素 A 受体 (CAML) 作用于 Ca^{2+} 库上的亚类, 如钙网硬蛋白和 SERCA₂, 但不包括 IP₃R。结果表明, CAML 通过激活 Ca^{2+} 库-操纵的 Ca^{2+} 内流途径引发 Ca^{2+} 信号的传递。

GAP1^m 是最近才发现的 IP₄-结合蛋白, 属于 GAP1 家族, 受 Ras GTP 酶调控。GAP1^m 可能的作用机制是促进 IP₄ 释放 2, 4, 5-三磷酸肌醇。一个有趣的假说是 ER 上的 GAP1^m 具有调节 Ca^{2+} 释放的功能。免疫定位和细胞亚组分的分离实验证实, 在 COS-7 细胞中, GAP1^m 并不与过表达的 SERCA1 共同存在, 在 RBL-2H3 细胞中也不与其他的 Ca^{2+} 库蛋白共同存在。

第二节 肌细胞

一、 Ca^{2+} 库的定位

(一) 骨骼肌中 Ca^{2+} 库的位置

骨骼肌细胞快速的兴奋-收缩耦联, 需要肌纤维细胞胞浆中的 Ca^{2+} 浓度迅速地升高。因为肌丝比较粗, 在结构上它具有质膜的凹入 (T-小管) 以引导电信号的传递, 肌浆网上的 Ca^{2+} 库分布在肌原纤维的周围。SR 上存在专门的区域, 即终点池或功能区, 在结构上与所谓的三磷酸功能区的 T-小管相连。在终点池的膜上富含 RyR 和腔面 CaBP 肌钙蛋白, 并形成了所谓的“重”SR, 反之, 在 SR 的其余部分存在着较多的 SERCA 泵。

(二) 心肌中 Ca^{2+} 库的位置

心肌细胞中 Ca^{2+} 库的位置同它的功能一样, 受到心肌细胞的种类和动物种类的影响。因为哺乳动物的心室肌是心肌 SR 的主要来源, 因此这里我们只对心室肌加以讨论。

这类细胞的 SR 至少可分为三个区, 即网状 SR、连接 SR 和小管状肌浆网。前两个区分别与骨骼肌的管状 SR 和连接性 SR 相对应, 网状 SR 存在于肌原纤维周围, 对它的超微结构进行观察未发现电子致密物, 连接 SR 和小管状肌浆网腔中存在电子致密物并与网状 SR 相连, 连接性 SR 与 T-小管相连, 并与质膜形成连接。管囊状 SR 由网状 SR 延伸出的球状物组成, 并远离膜或 T-小管的背面。同骨骼肌一样, 心肌的 SR 主要存在于肌小节的 I-带状区的中心地带。

(三) 平滑肌细胞的 Ca^{2+} 库的位置

平滑肌细胞中的 ER 不如心肌和骨骼肌细胞中的 SR 发达, 尽管它们的体积之间的差别并不像过去说的那样大。平滑肌细胞中 ER 的含量为 1.5%~7.5%, 在弹性动脉和妊娠子宫平滑肌中 ER 的含量更多一些。在许多平滑肌细胞中, ER, 尤其是处于胞核周围的 ER 多为粗面内质网。粗面内质网与 Ca^{2+} 库和 Ca^{2+} 释放的关系还不清楚, 但已知在肺动脉平滑肌上 ER 的中央区可形成 Ca^{2+} 聚集并释放 Ca^{2+} 。平滑肌细胞的种类不同, 表面的和中央区的 ER 含量也不一样。大多数的平滑肌细胞的 ER 囊池分布于细胞的周边部, 经常靠近质膜小凹 (caveolae) 或含有 Ca^{2+} 离子内流通道的位点, 也可在 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换器和 Na^+/K^+ 泵位置。有时在表面的 ER 和质膜之间, 也可以观察到类似骨骼肌 SR 和 T-小管的终池的桥状结构。在这些区域, ER 的腔内电子密度更高, 推测这些电子致密物质相当于隐钙素 (calsequestrin), 在一些平滑肌细胞已经得到证明。

二、 Ca^{2+} 库的纯化技术

(一) 骨骼肌细胞的 SR 的分离

因为骨骼肌中含有丰富的 SR, 因此它的纯化步骤相对简单且纯化程度高。然而, SR 的收率、稳定性和纯度都与动物和细胞的种类有关。在兔和蛙的骨骼肌上分离 SR 的技术比较成熟, 而在大鼠上得到

的SR对 Ca^{2+} 的转运能力随时间衰退。通过差速离心法获得的SR中主要混有收缩肌丝、线粒体碎片、T-小管和腺苷酸激酶等。用0.6 mol/L的KCl孵育并冲洗可除去大部分的肌动蛋白，再通过蔗糖密度梯度离心可除去其他的混杂物，接着可对网膜进行进一步的分离。

1. 匀浆和速度沉降 将肌组织剪成碎片，与匀浆介质混匀后进行研磨。然后低速离心除去肌丝碎片、肌原纤维、胞核和线粒体，再进行高速离心。将离心得到的沉淀小泡重悬在0.6 mol/L的KCl，并再次离心。流程图见图10-4。

2. 蔗糖密度梯度离心 使用20%~45%的蔗糖对上述的初提品进行连续性密度梯度离心，可获得两个分开的区带。选择合适的蔗糖浓度可对亚组分进行再次细分。通过这种方法可获得SR的“轻”组分和“重”组分。当制备较多的样品时，可选用区带转子(zonal rotor)来代替固定角度(fixed-angle)转子或旋转(swing-out)转子。

密度为30%的蔗糖区带中主要含纵向的SR，并富含SERCA泵。35%~40%蔗糖区带中主要含SR的“重”组分，包括终池/细胞连接处SR。这两个组分的密度大主要是因为它们含CaBP，如肌钙蛋白和RyR。有的也采用比较温和的匀浆方式。Mitchell等提供的方法中包括了纯化用的蔗糖密度梯度离心法。

(二) 心肌SR的制备

心肌细胞中SR的含量不如骨骼肌中的含量高，因此对SR的纯化就比较困难。另外SR中存在的两三个组分使对SR的再次分离也存在着问题。

1. 可参照的方法 Fleischer等提供的纯化犬心肌SR的方法可以达到较高的纯度，且其对 Ca^{2+} 的转运力也比较稳定。他们使用的是较温和的匀浆方式和蔗糖密度梯度离心。若对纯度要求不太高的话，还可采用略简单的方法。还有一种方法就是从分离的心室肌细胞上纯化SR。

2. 用钙-草酸盐负载法纯化SR 能够获得纯化程度较高的一种方式就是钙-草酸盐负载法，即将粗分得到的腔中的SR囊泡，在 Ca^{2+} 摄取介质中与草酸盐共同孵育，从而形成钙-草酸盐沉淀物。草酸盐能够穿透胞膜，钙-草酸盐复合物的水溶性很差，因此在SR的腔中阴离子的草酸盐和 Ca^{2+} 的浓度很低，这样通过延迟 Ca^{2+} 升高而抑制泵的活性。当与膜孵育足够长的时间后，囊泡中形成了足够多的钙-草酸盐晶体和非泄漏的囊泡，并具备 Ca^{2+} 转运的

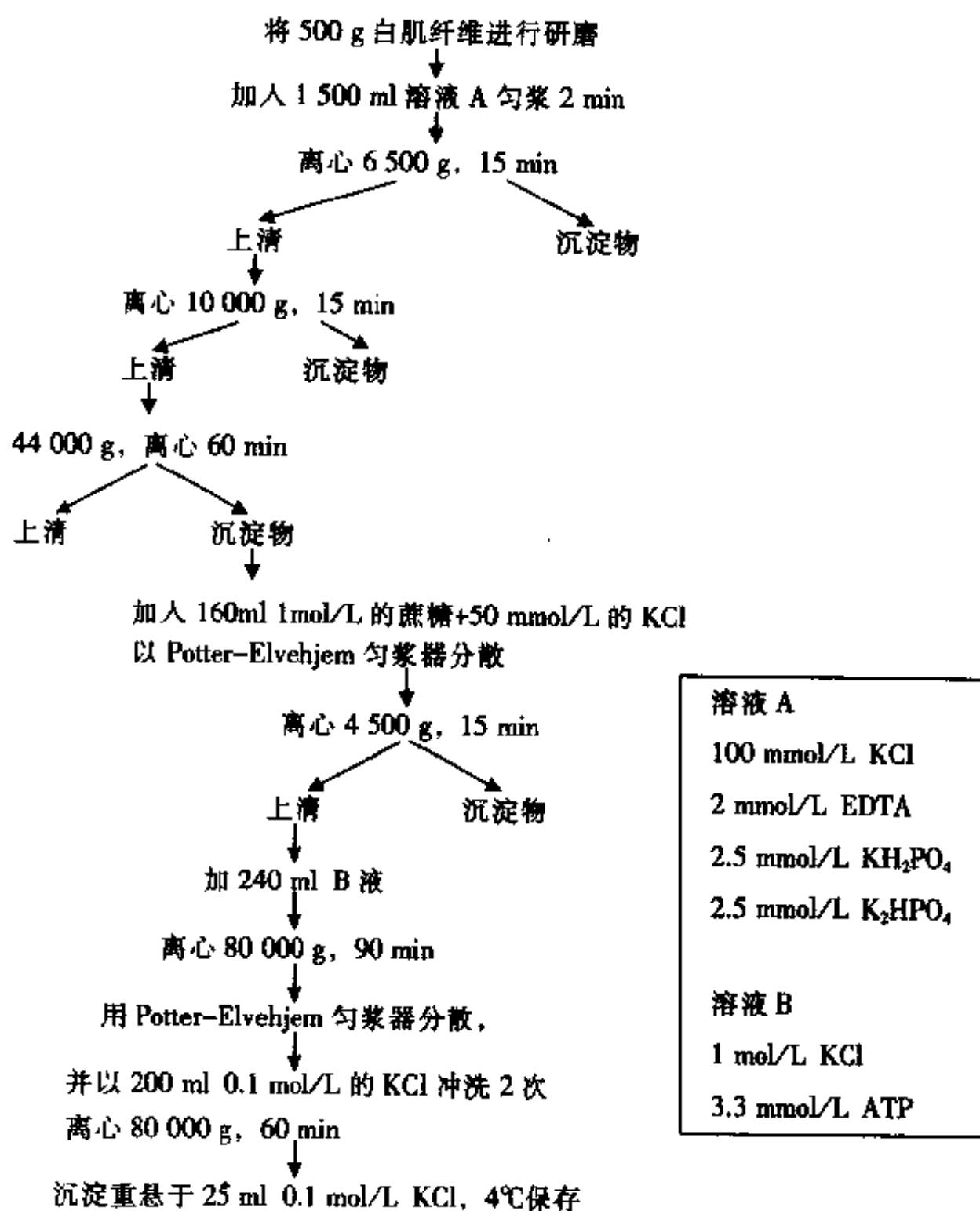


图 10-4 骨骼肌 SR 分离的流程图

位点。这时通过离心即可将这种囊泡与非 SR 和泄漏型囊泡分开。这种分离方式也存在缺点,即分离得到的囊泡 Ca^{2+} 转运活力强而不具备 Ca^{2+} 释放通道,因此这一纯化产物仅是 SR 的一部分。已有研究表明,草酸盐负载的囊泡对 ryanodine 不敏感。此外,钙-草酸盐沉淀物对随后的 Ca^{2+} -摄取活性的测量等会产生不利影响。

(三) 在平滑肌细胞中制备 ER

在典型的平滑肌细胞中,表面膜的面积远比 ER 要大。因此在平滑肌细胞中纯化 Ca^{2+} 库的主要问题是去除质膜,另一个问题是,与骨骼肌和心肌相比,平滑肌中 Ca^{2+} 库的含量也少,其性质也未了解。尽管曾做过许多努力以除掉质膜,但分离得到的膜成分只包括内膜,如滑面 ER,而不含粗面 ER。

1. **匀浆** 由于平滑肌中富含胶原蛋白,血管中弹性蛋白较多,因此对平滑肌的匀浆就比较困难。有许多实验中使用剪刀剪碎、研磨和 Polytron 匀浆的方法。当材料比较多达几百克时,用自制的不锈钢挤压机,使组织碎片先通过 1 mm 的孔,再通过 0.5 mm 的孔进行过滤。

2. **常规蔗糖密度梯度离心** 用蔗糖密度梯度离心分离的部分富含质膜或 ER 的标识蛋白,但在 ER 部分,草酸盐激发的 Ca^{2+} 摄取蛋白的含量不多。

3. **其他方法** 为了在平滑肌上获得更纯的 ER,这里有两个可供选择的方法:首先是草酸钙负载法,其结果是得到的对 Ca^{2+} 转运有活性膜泡;另一个方法就是使用洋地黄皂甙增加质膜的密度。将洋地黄皂甙处理过的膜成分进行蔗糖密度梯度离心后,质膜停留在密度高 (>28%) 的蔗糖带中。对停留在密度低 (18%~25%) 的蔗糖带中的膜进行分析发现,这里富含 SERCA 系,并没有质膜的混杂。分离得到的部分常用于研究平滑肌中受磷蛋白 (phospholamban) 调节的 Ca^{2+} 泵和识别腔面的 CaBP。

三、 Ca^{2+} 库的性质

(一) SERCA 系

1. **SERCA 的亚型** 与非肌细胞相比,肌细胞中的 SR 高度分化。不但 Ca^{2+} 泵分区明显,而且 SERCA 的几种亚型也能区分开来,且呈高表达状态,比非肌细胞中几乎高 100 倍。

快肌纤维是唯一表达 SERCA1 的细胞。当对 SERCA1 的基因图谱进行结合后,可产生两种蛋白亚型: SERCA1a 主要在成年肌细胞中表达;而 SERCA2b 主要在新生期的肌细胞中表达; SERCA2 只在胚胎期短暂表达。

慢肌纤维细胞和心肌细胞特异性地高表达 SERCA2a,但比快速骨骼肌的表达水平略低。与非肌细胞相似,平滑肌细胞中主要有 SERCA2b 的表达,但其表达量相对低。也有一些平滑肌中同时有 SERCA2a 的表达。

2. **SERCA 的调节蛋白** 至少有一部分的 SERCA 受附加蛋白的调节。研究的比较透彻的是 SERCA2a 的调节方式,即 cAMP 蛋白激酶通过促进受磷蛋白的磷酸化实现的。受磷蛋白在未磷酸化状态下对 Ca^{2+} 泵有抑制作用,当心脏的肾上腺素能神经激动,受磷蛋白磷酸化,对 Ca^{2+} 泵的抑制作用解除,能迅速地摄取 Ca^{2+} 。理论显示受磷蛋白能与 SERCA1 和 SERCA2 发生作用,但离体状态下只观察到它对 SERCA2a 的调节作用,这是因为受磷蛋白只在有 SERCA2a 表达的细胞中存在。

Sarcoplipin 是与受磷蛋白相似的另一小分子蛋白,与受磷蛋白不同的是, Sarcoplipin 的表达模式与 SERCA1 接近,因此它能够降低 SERCA1 对 Ca^{2+} 的亲合力,而 V_{\max} 提高。离体状态下 Sarcoplipin 对 SERCA1 的调节是通过减少它自身的表达实现的。

(二) CaBP

1. **肌钙蛋白** 因为骨骼肌细胞中 SR 面积大且分布广泛,在较大程度上骨骼肌细胞的收缩与胞外 Ca^{2+} 无关,胞浆中的 Ca^{2+} 大多来源于 Ca^{2+} 库。在 SR 的腔中,只有一部分的 Ca^{2+} 是游离态的,其余均与 CaBP 结合。CaBP 多为肌钙蛋白,这是一种酸性蛋白,位于终池 (心肌中的 corbular SR)。与肌钙蛋白

结合的 Ca^{2+} 存在于 Ca^{2+} 释放通道的附近, 对其功能有调节作用。哺乳动物中有肌钙蛋白的两种亚型, 即骨骼肌型和心肌型, 这两种亚型的肌钙蛋白在平滑肌中也有不同程度的表达。

2. 其他类型的 CaBP 除肌钙蛋白外, 骨骼肌和心肌中还存在着其他类型的 CaBP。尽管我们知道这些蛋白影响着 SR 的 Ca^{2+} -结合能力, 但对它们是如何起作用的还不知道。这些蛋白包括非肌细胞中的 CaBP 网硬蛋白、GRP94、sarcolumenin 和组胺酸- Ca^{2+} 结合蛋白 (HCP)。

平滑肌细胞的 ER 对 Ca^{2+} 的缓冲是通过一些非肌细胞 CaBP 实现的。另外, 在平滑肌细胞中也有少量的 sarcolumenin、HCP 和肌钙蛋白的表达。

(三) Ca^{2+} 释放通道

1. 哺乳动物的骨骼肌和心肌 RyR 是肌细胞 SR 上的 Ca^{2+} 释放通道, 同 Ca^{2+} 泵一样, RyR 在肌细胞中的表达要比在其他细胞中多。一般来说, RyR 位于终池和 corbular SR, 并向外延伸形成了所谓的“脚”状结构。当接近 T 小管或表面的膜时, 这一结构与膜对面的二氢吡啶受体结合。这些质膜蛋白的作用类似心肌上的 Ca^{2+} 内流通道或骨骼肌上的电压传感器, 能够将兴奋信号传递给 RyR。

哺乳动物的骨骼肌上存在着 RyR₁, 而 RyR₂ 存在于心肌。骨骼肌和心肌都有 RyR₃ 的表达, 但表达量较小。另外, 骨骼肌和心肌都含有少量的 IP₃R。它在骨骼肌中的表达最少, 而且代表 RyR 的 mRNA 仅有几个百分点。IP₃R 仅在具有氧化能力的 I 和 II A 肌纤维中存在, 而在糖酵解型 II A 肌纤维中没有。除了最近发现的在骨骼肌和心肌中存在合成 IP₃R₂ 的 mRNA 外, 还没有人在骨骼肌中用免疫定位法发现这一受体的存在。在心肌的心室肌细胞和心房肌细胞中, 已有人证明 IP₃R₂ 的含量很高, 尤其在心房肌的蛋白表达水平更高。也有人报道, 在普肯耶肌细胞中 IP₃R₁ 的含量高, 而在心房肌细胞, IP₃R₂ 存在于核周和肌纤维膜下, 而且在肌纤维膜下与 RyR₂ 共同存在, IP₃R₃ 也分布在核周, 在心室肌, 核周只有 IP₃R₂, 而 RyR₂ 分布在功能 SR。有人报道, 用免疫定位法和细胞亚组分分离法观察到, 心室肌的 IP₃R₁ 分布于闰盘内, 而 RyR₂ 位于功能 SR。

2. 非哺乳动物的肌细胞 与哺乳动物的 RyR₁ 和 RyR₂ 的互补型分布模式不同, 在非哺乳动物的肌细胞中, 不同亚型的 ryanodine 受体是共同存在的。在这种细胞中, ryanodine 受体被分为 α 和 β 型 (类似于 RyR₁ 和 RyR₃), 在如鸡、蛙和鱼等快速转换的肌纤维中是共同表达的。

3. 平滑肌细胞 RyR₂ 和 RyR₃ 在平滑肌细胞中均有表达。我们还不知道不同亚型的利阿诺定 (ryanodine) 受体是否也具备不同的功能。平滑肌细胞中的 RyR 位于 ER 的四周和中央部分, 而且通过 RyR 释放的 Ca^{2+} 不但能引起收缩, 还能通过激活 Ca^{2+} 敏感型 K^{+} 通道引起平滑肌的舒张。平滑肌上富含 IP₃R₁, 因此对它的纯化也比较容易 (动脉平滑肌、静脉)。在动脉平滑肌中 IP₃R₁ 主要位于 ER 的中央, 而在静脉 IP₃R₁ 位于 ER 的四周。尽管 CaBP 肌钙蛋白在 ER 腔中呈分散聚集的状态, 但在静脉中我们发现 IP₃R₁ 与肌钙蛋白是共同存在的。通过细胞亚组分分离法我们发现在纵向的平滑肌上, IP₃R 和 RyR 的分布方式是不同的, 在粗面内质网上 IP₃ 受体的含量多一些。

(四) 肌细胞 SR 中的其他组分

除了 Ca^{2+} 泵、 Ca^{2+} 释放通道和 CaBP, 肌细胞的 SR 中还有其他几种组分, 但这些物质含量都比较少, 这里不做详细讨论。这些蛋白质都镶嵌在膜上, 它们包括阴离子通道、 K^{+} 通道和阴离子载体。这些载体的功能是转运膜上的草酸盐, 而阴离子通道主要是在 Ca^{2+} 释放和再摄取过程中起到中和电荷的作用。已有实验证明在肌细胞中存在 SR 结合肌氨酸激酶, 它的位置离 Ca^{2+} 泵很近, 能够保持 ATP 与 ADP 的比率较高, 从而促进 Ca^{2+} 泵的作用。

与 RyR 有关的一些重要的功能蛋白, 与肌钙蛋白、三联体蛋白 (triadin) 和 junctin 一起构成四个结构域, 这些附加蛋白对 Ca^{2+} 通道的开放是必需的。我们知道肌钙蛋白能够调节 RyRs 释放 Ca^{2+} 的数量, 那么其他的蛋白可能参与了肌钙蛋白对 Ca^{2+} 释放的调节机制。

FKBP12 和 FKBP12.6 是两种与 RyR 的构象密切相关的蛋白, 这两种蛋白为顺/反肽基-脯氨酸异构体, 其活性随构象的变化而不同。当使用 FK506 或 rapamycin 除去这两种蛋白时, ryanodine 敏感的 Ca^{2+}

通道的开放增加。RyR₂ 与 FKBP12.6 有关, 而 RyR₁ 与 immunophilins 相连。

ER 是一个不均一的细胞器, 尤其表现在对 Ca²⁺传递的影响。与 Ca²⁺传递有关的位点的结构, 即 Ca²⁺库的结构也是变化的, 它与细胞的种类和分化状态有关。在本章里, 我们对一些比较重要的技术进行了综述, 这些技术包括细胞裂解法、Ca²⁺库的分离法及分析方法。在实验中要根据细胞或组织的种类选择所用技术的种类。直到现在, 人们仅对几种类型的细胞结构、分子性质和 Ca²⁺库的位置进行过详细的研究, 若要更多地了解 Ca²⁺库的性质和它对 Ca²⁺信号的产生和传播的作用, 需要进行更深入的研究, 例如在尚未研究过的细胞上进行生物化学和免疫细胞化学的研究。相信人们会开发出更新更好的抗体, 从而在这一领域做出新的成绩。同时, 为了更好地了解参与 Ca²⁺传递的蛋白的性质和功能, 也需要开发出更先进的技术。

第十一章 研究钙信号的蟾蜍卵母细胞

蟾蜍卵母细胞作为一个模型广泛地用于研究细胞内信号至少有 50 年历史，它的最显著特点是细胞尺寸大。卵母细胞在发生时经历 I、II、III、IV、V 和 VI 期，其中全生长卵母细胞（VI 期）最常用于实验，它的直径在 1~1.3 mm 之间，因此这期卵母细胞很容易进行大分子微注射，甚至可以进行细胞器如细胞核、线粒体和分泌囊移植。20 世纪 60 年代人们用生化分析证实 VI 期卵母细胞含有蛋白合成所有必需物质。20 世纪 70 年代 Gurdon 和其同事发现 VI 期卵母细胞非常适合异体 mRNA 表达，以后，这项技术得到发展，经过特别设计后可增加表达 mRNA 的稳定性。从那之后，蟾蜍卵母细胞表达系统在许多离子通道和其他蛋白质结构、功能研究中得到广泛应用，特别是在揭示钙信号机制上起着重要作用。

最初，Miledi 用聚 A⁺选择的 mRNA 注入卵母细胞的方法，来研究激素受体激动的细胞内钙释放，随后的重要发展是使用蟾蜍卵母细胞研究 Ca²⁺信号时发现内源性电生理指示剂，并揭示了其特点。特别是 Miledi 和 Park 在蟾蜍卵母细胞质膜上描述和总结了 Ca²⁺敏感 Cl⁻电流，这些测量都充分利用能聚合浆膜下钙变化的自然指示剂。最初研究使用 Ca²⁺敏感 Cl⁻电流清晰地演示了 IP₃ 介导的 Ca²⁺释放通道。最近，共聚焦显微镜的应用大大拓宽了利用蟾蜍卵母细胞模型系统来研究钙信号的应用范围，研究者可以研究胞内钙释放的大规模复杂的空间—时间模式，也可以研究单通道钙释放的分泌过程，也称为钙流。这样蟾蜍卵母细胞在单个细胞内既有简单短暂表达系统的优点，又能应用精确 Ca²⁺测量技术进行 Ca²⁺研究，因而是研究钙信号非常有用的标本。

本章简要回顾蟾蜍卵母细胞胞内钙信号的基础知识，另外还要描述应用蟾蜍卵母细胞表达系统，并叙述共聚焦钙成像测量技术研究钙信号的方法。

第一节 钙信号

一、Ca²⁺信号的胞内成分

IP₃ 诱导的胞内钙释放调节许多激素和神经递质通路的活动。钙信号控制许多过程如分泌、细胞增殖和分化。钙释放机制首先是酪氨酸激酶或 G-蛋白调节的 PLC（磷脂酶 C）激活，这些通路可以激活并能用蟾蜍卵母细胞来研究。PLC 催化 PIP₂ 产生 IP₃，它从质膜扩散至胞液，随后 IP₃ 结合到 IP₃ 受体（IP₃R），从内质网（ER）释放 Ca²⁺。细胞内钙池由功能分泌释放单位组成，它们能代表 IP₃R 家族。当 IP₃ 和受体结合时，这些功能单位产生局限性的钙信号（即钙流），从肌肉细胞利阿诺啉（ryanodine）受体（RyR）释放的同样的信号称为钙火花。然而在卵母细胞没有 RyR 的内表达，系列激活和基本释放位置叠加导致钙波传导。IP₃R 至少有三种亚型被识别和克隆，但只有 IP₃R I 型在蟾蜍卵母细胞表达。近来钙-ATP 酶内质网上局部的 IP₃R 通道释放的 Ca²⁺很快被隔离成细胞内储存。用 spliced variant（缝接变体）SERCA1a 和 1b 及 2a 和 2b 已克隆出结构相关的肌浆网 Ca²⁺ATP 酶或 SERCA 家族，SERCA2b 和 SERCA3 在卵母细胞内源性表达。Lytton 等测量了所有 SERCA 的 Ca²⁺敏感能力和运输能力，Ca²⁺运输特点在所有的同工型除了 SERCA2b 之外均类似，SERCA2b 运输能力低，对 Ca²⁺敏感（K_d 200 nmol/L），而 SERCA3（K_d 1 μmol/L）对 Ca²⁺最不敏感，SERCA3 的特殊功能仍不知晓，由于它对 Ca²⁺不敏感，它可能参与细胞亚室的钙运输，那里的钙浓度相当高，这样当 SERCA2b 钙运输饱和时，低亲和力的 SERCA3

将有效运输高钙。SERCA_{2b} 和 SERCA₃ 的联合表达似乎代表了其他细胞的传统分类如“兴奋性”，我们不愿分这么清楚，因为大多数非兴奋细胞有 IP₃ 介导的由钙控制的胞内兴奋系统，在质膜上，它不依赖于电压门控离子通道。最后，卵母细胞也表达 ER 上的钙结合蛋白。我们简要回顾一下使用卵母系统去研究 calreticulin 在钙信号中的作用。在蟾蜍卵母细胞中 calsequestrin 的作用还不清楚，但它于 RE 腔的钙储存有关，在其他种类细胞中，已证实 calsequestrin 介导 RyR，然而在卵母细胞中由于无 RyR，因此就没有类似的作用。当没有特殊的成分时，由于蟾蜍卵母细胞信号系统较简单，因此是研究外源性成分对信号传导影响的最佳选择。例如，和其他细胞相比，卵母细胞的内源性胞液钙结合蛋白 (CaBP) 浓度非常低，CaBP 能高至毫摩尔浓度，导致结合钙/游离钙的比率超过 100:1。在蟾蜍卵母细胞比率仅有 (10~15):1。这样，可以通过 CaBP 过表达或将其直接注射至卵母细胞来研究 CaBP 对 IP₃ 介导的钙信号影响。

二、Ca²⁺释放

应用共聚焦显微镜，根据卵母细胞注射后达到的 IP₃ 终浓度可以观察到 Ca²⁺ 释放的不同方式 (图 11-1)。在低 IP₃ 浓度 (50 nmol/L) 可以观察到稀疏的钙释放过程或钙流 (钙火花)。在较高的 IP₃ 浓度 (100 nmol/L)，能观察到在短距离 (10~50 μm) 非对称传导的中止的钙波。一般 IP₃ 浓度在 1~10 μmol/L 时，可以观察大而整齐、不重复的钙释放。在中间浓度 (IP₃ 300 nmol/L)，在多焦位置观测到复杂的 Ca²⁺ 震荡，产生破碎的、环形的或者旋转的波形。碰撞后钙波消失意味着出现一个 Ca²⁺ 释放暂时抑制的基础不应期，这些基本观察具有兴奋介质的特点。旋转和环形的波形可在许多系统观察到，从粘菌 *Dictyostelium discoideum* 的积聚物，到 Belousov-Zhabotinsky 化学反应及神经和肌肉细胞的电活动，这样兴奋性的网络可延伸至胞内钙信号发生。因此，把细胞分类为可兴奋和非兴奋细胞，只有在考虑质膜的电压依赖离子通道的有限观察时才有效。在心、肝、脑、视网膜已证实胞内可兴奋的构架组织是胞内钙信号。

三、钙诱导的钙释放

当 IP₃R 和其配体结合时，它的钙依赖性最终对观察到的钙释放方式负责。在低钙浓度时，IP₃R 离子通道关闭；当增加胞质基质钙时，通道开放的可能性增加了。CICR 指从 IP₃R 通道 Ca²⁺ 释放的正反馈。然而，在高浓度钙时，通道不能激活。IP₃R 的 II、III 亚型没有其 I 型一样的钙依赖性，这两种亚型对高胞液钙抑制不敏感，另外，因为只有 I 型受体是内源性表达，所以蟾蜍卵母细胞过表达为我们提供一个很好的机会去研究 IP₃R II、III 亚型的特点。近来报告

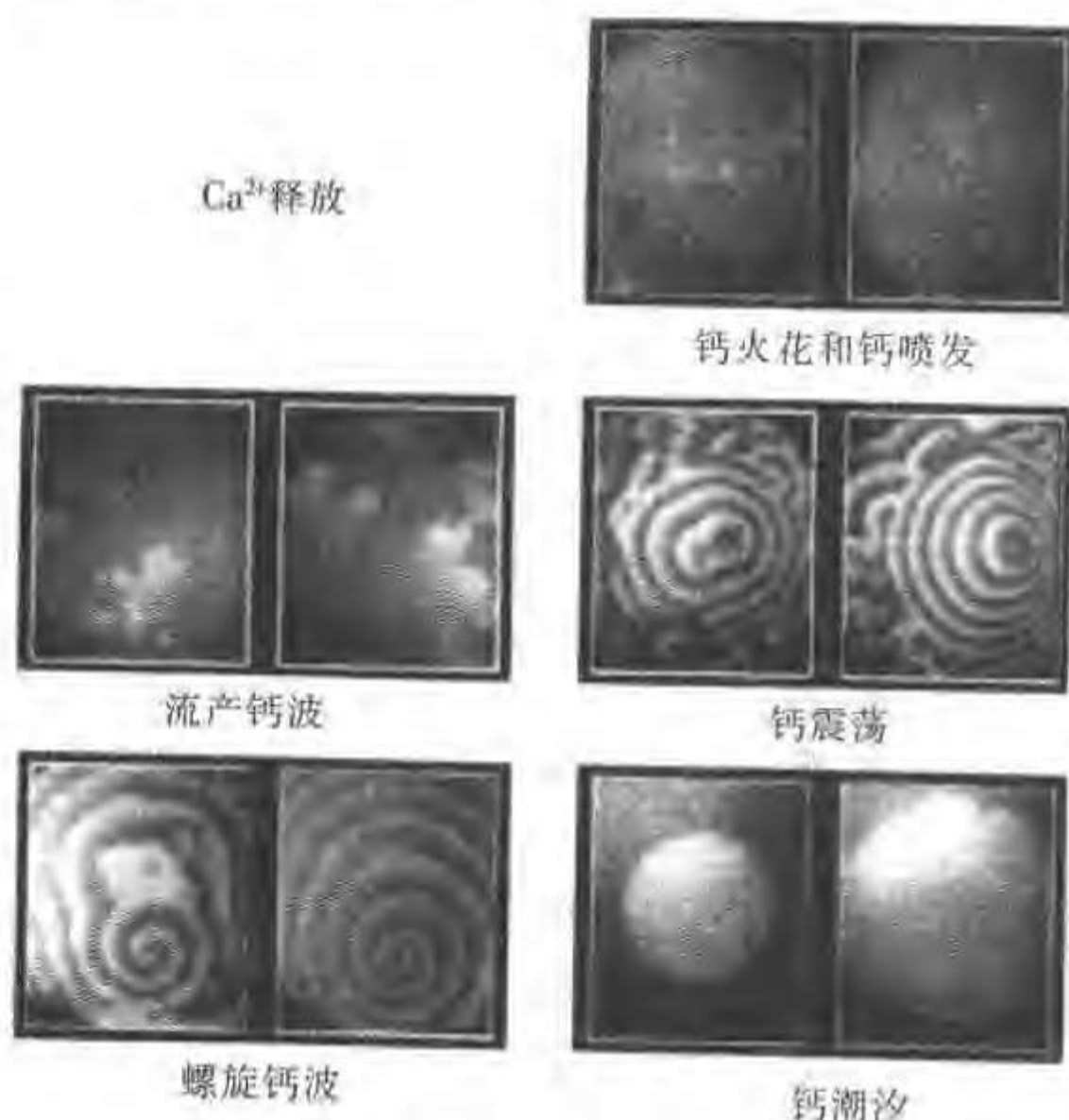


图 11-1 蟾蜍卵母细胞 Ca²⁺ 释放模式。对于不同浓度 IP₃ 反应导致 Ca²⁺ 释放的共聚焦图像显示：在约 50~100 nmol/L 可观察到钙火花 (spark) 或钙喷发 (puff) (图右上部分)，在 100 nmol/L~300 nmol/L，可观察到流产的 (abortive)、非对称传播的钙波 (图中间左侧部分)；在约 300 nmol/L IP₃ 作用下，可出现重复的钙波 (图中间右侧部分)，通常这些钙波从 Ca²⁺ 释放的震荡中心开始，并可形成靶样图案，在同样的浓度条件下，也可产生螺旋形钙波 (图下部左侧部分)；在 IP₃ 浓度为 1 μmol/L 左右经常可观察到钙潮汐现象

IP₃R 有 7 个钙结合位点, 两个是在 IP₃ 结合区, 4 个在调节区, 最后一个在透膜片断 5 和 6 (TM5、TM6), 这些位点的功能尚不知晓, 但他们在决定 IP₃ 介导的钙释放的钙依赖中起重要作用。单个钙释放位点(钙流)通过钙释放和兴奋性介质结合, 与 CICR 过程一起, 这个介质能传导 Ca²⁺波, 当兴奋性受体的密度非常高以至于从受体释放的钙能扩散和激活它邻近的受体时, 钙波传导是可能的。这样, 与最近兴奋的 IP₃R 的距离和钙释放的量是速率限制方式。增加 IP₃ 的浓度可使最近 IP₃ 结合的 IP₃R 距离缩短, 此时通道被认为是不饱和, 这样, IP₃ 浓度决定钙流是否转化成非对称中断钙波以及后者是否转化成持续电流。

四、用蟾蜍属卵母细胞研究钙信号的优点

Ca²⁺的释放方式在生理反应中非常重要, 例如, 局部钙火花的钙释放能降低平滑肌的张力, 而通过钙波的钙全面释放, 能引起平滑肌细胞的收缩。据报道钙震荡能编码特定的细胞功能。Gu 和 Spitzze 证实神经突生长、分泌和 K⁺电流的发育变化依赖于钙震荡。肝细胞中线粒体的呼吸依赖于钙波的频率, 最近证实基因翻译也依赖于钙震荡的频率。在 AtT20 细胞, 含有 cAMP 反应元素 (CRE) 的基因转录激活由细胞核内的钙瞬时增加控制。而含有血清反应元素 (SRE) 的基因表达由胞液瞬时钙控制。这样对 IP₃ 介导的钙信号的空间和(或)时间解释是理解细胞功能激素控制的重要一步。

蟾蜍属卵母细胞表达系统的关键特征在于它相对简单的生理特点, 它能使胞内钙信号变化的数据分析和解释得到很大的简化。此外, 人们可以通过研究蟾蜍卵母细胞 Ca²⁺波的特点, 明确体积较小细胞 Ca²⁺波发生的规律。因为在较小细胞, Ca²⁺测定不易, 而发生规律却与在卵母细胞相似, 并且小细胞 Ca²⁺活动的空间分辨范围较小, 很难获得很好的空间分布特征。已发现在多种细胞类型以及细胞间通过间隙连接的组织也有传导的钙波。例如, 有报道在心肌细胞和海马培养物上有螺旋型钙波。这样通过从卵母细胞上获得的信息对我们理解所有类型细胞的钙信号有很大的帮助。

第二节 钙信号的控制

已发现在蟾蜍属卵母细胞中 IP₃ 介导的钙信号有 5 个决定步骤, 它受到钙缓冲和钙分离的影响, 但活体的钙依赖钙信号知之甚少(图 11-2)。例如, Stehno-Bittel 和 Clapham 报道蟾蜍卵母细胞核 IP₃R 的铃形钙依赖变成了更高的钙浓度, 此值比从双层研究或微粒体标本得到的钙值要高 (Neuron, 1995; 14: 163)。在双层膜研究中, IP₃R 通道的峰值在 300~500 nm 之间, 而核壳的 IP₃R 的膜片钳测量峰值却在 1 μm。这个差异揭示研究钙信号的过程时活体测量的重要性。此外, 在体内平衡范围内, 为维持细胞内钙水平, 多种生理机制同时起作用。下面回顾一下由 SERCA、钙网硬蛋白 (Calreticulin) 和线粒体介导的钙信号控制。

一、肌浆网钙-ATP 酶 (SERCA) 和钙信号

通过泵钙或穿过质膜或回到内质网储存, 钙水平可以维持或恢复到静息水平, 认为钙泵将介导 IP₃ 诱导的钙信号。下面着重介绍肌浆网 Ca²⁺-ATP 酶 (SERCA) 的信号特点。

把 IP₃ (终浓度 300 nmol/L) 注入蟾蜍属卵母细胞, 马上启动钙释放的整齐钙波, 最后覆盖整个卵母细胞。2~3 min 后, 钙波退却出现一个低频震荡。SERCA 同工酶的过表达能完全改变这个活动。最初从 mRNA 编码 SERCA1 (骨骼肌 Ca²⁺-ATP 酶) 注入卵母细胞得到证实。3~6 d 的过表达, 可以看到钙波幅度和频率比注入同样浓度 IP₃ 的对照组明显增加。波幅的增加可能是因为钙储存增加的原因。此后, 由于较大的驱动力, 更多的钙通过 IP₃R 通道释放出来。这将导致较大的波幅和较高的振荡频率。由于钙对 IP₃R 的抑制效果, 增加的 SERCA 活性将增加振荡频率。

另外两种钙-ATP 酶同工酶 (SERCA2a、SERCA2b) 对钙信号的 SERCA1 影响不同(图 11-3)。在

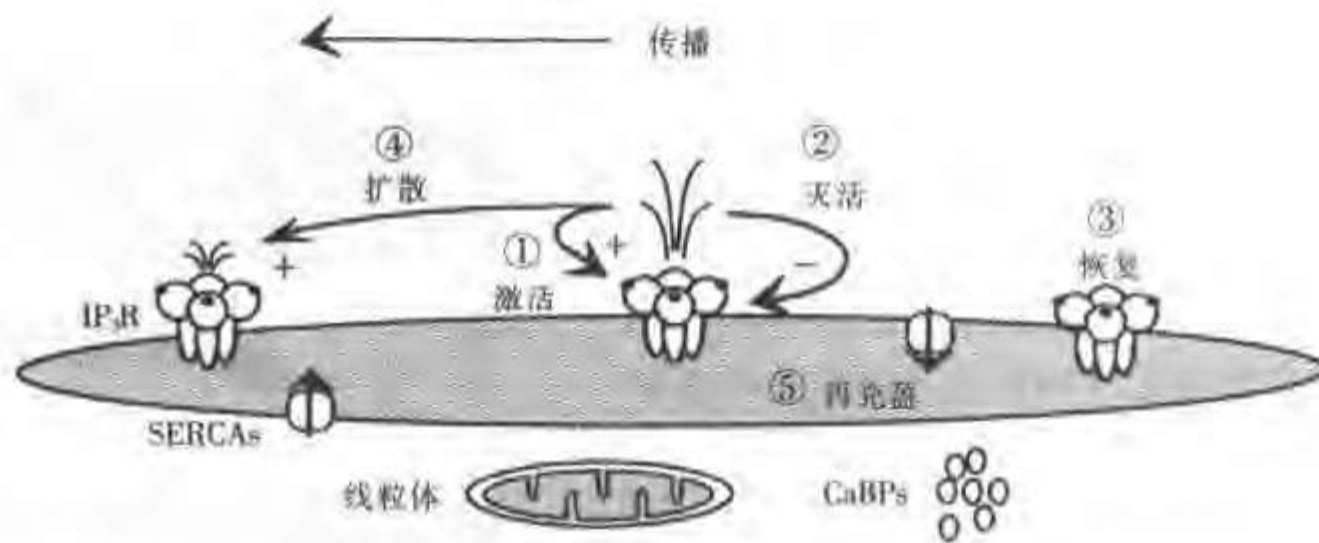


图 11-2 IP_3 介导的 Ca^{2+} 信号传播 (propagation) 过程。①激活: 当 IP_3 与 IP_3 受体结合时, 在低 Ca^{2+} 浓度条件下, Ca^{2+} 作为共激动剂 (co-agonist)。因此, 通过 IP_3 受体通道释放的 Ca^{2+} 可诱导 Ca^{2+} 的进一步释放 (Ca^{2+} 诱导的 Ca^{2+} 释放, CICR)。单个 IP_3 功能单位 (约 1-10 个通道) 的激活可造成钙喷发。激活的持续时间约为 1-10 ms。②灭活: 在胞质液高 Ca^{2+} 浓度, IP_3 结合受体进入非导电状态 (non-conducting), 可防止进一步的 Ca^{2+} 释放。通道灭活持续时间为 100-200 ms。③从灭活状态恢复: 在灭活后, 钙离子释放前的 2-3 s 的时间内可再被刺激。这种不应期可解释碰撞钙波的湮灭, 也限制了重复钙波的最大频率。④扩散: 当释放的 Ca^{2+} 扩散并经 CICR 激活邻近的 IP_3 受体后, 就可引起钙波的传播。 Ca^{2+} 的扩散可被内源性 Ca^{2+} 缓冲成分 (CaBP 和线粒体) 有效诱导。在决定钙波速率方面, Ca^{2+} 扩散是限速步骤。⑤钙池的再充盈: 在决定钙波频率方面钙池的再充盈 (refilling) 是非常重要的。在更长的时间尺度上, 钙池再充盈的效率对于钙池排空前重复钙波的数目也非常重要 (引自 J Cell Biol, 1998; 142: 963)

SERCA2b 的过表达钙波图像特点是波宽度较宽, 与之相反, SERCA2a 的波形是波宽度较窄。这些特征波形和根据钙亲和力、钙运输能力和 ER 中的局限化而定的每个钙 ATP 酶的已知生化特性是一致的。与 SERCA2a 相比, SERCA2b 的亲和力高, 钙运输速率低。SERCA2a 和 SERCA1 的生化特性很难区分。用绿荧光蛋白 (GFP) 标记每个 SERCA 的同工酶, 已证实 SERCA2a 和 SERCA2b 的差异, 不是由于过表达水平的差异造成的。发现在 GFP 荧光强度相同的情况下, GFP-SERCA2b 的过表达比 GFP-SERCA2a 的过表达出现的波宽要宽, 周期要长。这些数据显示钙-ATP 酶在钙信号中的重要性, 并揭示在激素信息的生理调整中新的目标。

另外, 这些实验说明了蟾蜍属卵母细胞标本作为研究钙信号的优点。通过瞬时表达我们能测定 SERCA 同工酶的效果, 不同的 SERCA 同工酶的钙波形的测量也是可能的, 因为随着分辨率升高, 能够对大规模钙释放的图形成像。

二、钙释放控制和钙网硬蛋白摄取

钙网硬蛋白 (Calreticulin) 和 Calnexin 是植物血

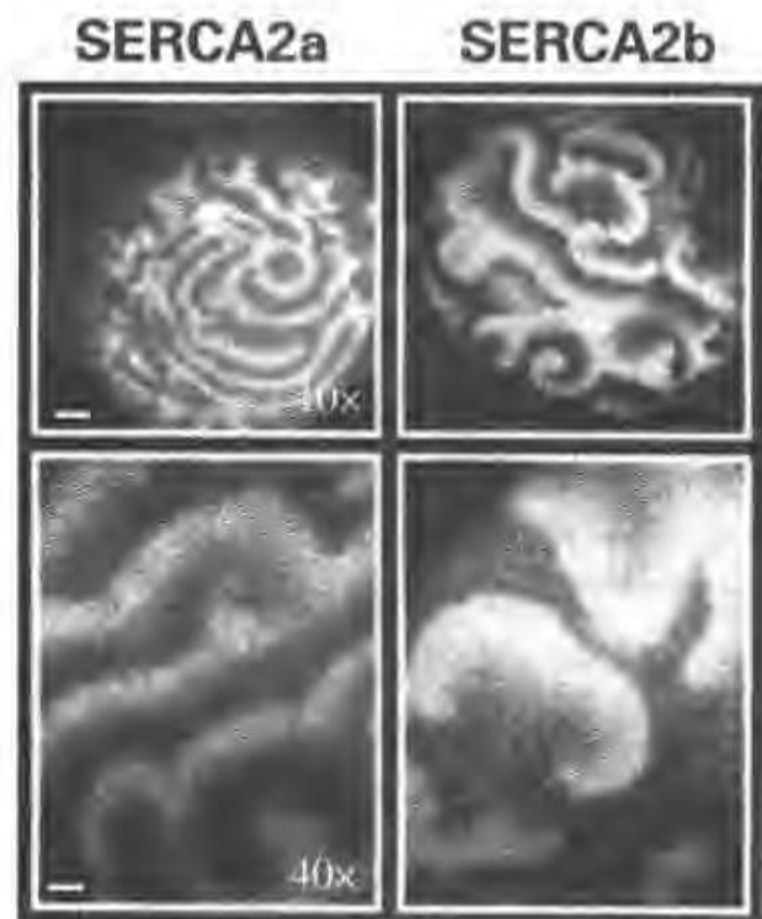


图 11-3 SERCA2a 和 SERCA2b 的过表达揭示 IP_3 诱导的重复性钙波活动在不同的同分异构体间的功能区别。在 SERCA2a (左侧) 和 SERCA2b (右侧) 过表达的卵母细胞, 终浓度约 300 nmol/L IP_3 诱导的 Ca^{2+} 反应的比较。上部两幅图是用 10x 物镜, 采集的 $745 \mu\text{m} \times 745 \mu\text{m}$ 的共聚焦图像 (标尺约 $100 \mu\text{m}$); 下部两幅图是用 40x 物镜, 采集的两个不同卵母细胞的 $240 \mu\text{m} \times 180 \mu\text{m}$ 共聚焦图像 (标尺约 $20 \mu\text{m}$)。钙波活动的图像是在最高活性采集的

凝素分子伴侣(chaperone)的一新类型,它们能介导内质网的蛋白折叠,分子伴侣在决定多肽正确自然折叠中起着重要作用。最近,我们的研究显示分子伴侣也介导糖蛋白的自然折叠。这个家族的分子伴侣能结合内质网里的单葡萄糖基形式的糖蛋白。

在蟾蜍属卵母细胞的钙网硬蛋白过表达可调节 IP_3 介导的钙释放,它的特征是在钙释放波时没有钙震荡而有胞液钙的持续升高,这和有 SERCA (去抑制钙再摄取) 或 IP_3R (延长钙释放) 的 calretin 功能反应一致(图 11-4)。尽管缺失高电容/低亲和力钙结合位点,但钙网硬蛋白对钙释放的影响仍然存在,因而认为钙网硬蛋白的高电容缓冲与它对钙震荡抑制无关。脯氨酸的丰富中心位点(P-位点)与植物血凝素活性有关,它保存在 calnexin 和 calmegin 里。最近证实钙 ATP 酶的 SERCA2b 同工酶是钙网硬蛋白的底物,钙网硬蛋白能通过和在 SERCA2a 的 COOH 端的葡萄糖残基反应来抑制 IP_3 介导的钙震荡。这个残基正对着 ER (内质网) 腔,存在于 SERCA2b 而不存在 SERCA2a,当我们把 SERCA2a 和钙网硬蛋白缺失突变体共表达时,钙震荡并不受影响;然而当它同样和 SERCA2b 共表达时,钙震荡则受到抑制。这样,能用钙网硬蛋白和 SERCA2b 相互反应来证实它的特点。另外,特定的抑制剂葡萄糖苷酶 I 和 II (能防止钙网硬蛋白结合单葡萄糖底物) 能对抗钙震荡的抑制效果。用诱变方法,证实 SERCA2b 的天冬酰胺残基 N1036 对植物血凝素的反应是必需的。更重要的是, SERCA2b 的单氨基酸替代(N1036A)使 SERCA2b 有 SERCA2a 样的功能特点。卵母细胞 N1036 SERCA2b 突变引起的过表达钙波特点和 SERCA2a 显著不同。这样 SERCA2 变异体间的差异特点归因于植物血凝素和 calreticulin 反应的存在与否,但需要进一步实验来阐明活体钙网硬蛋白 IP_3R 及其 SERCA2b 底物的反应的钙依赖性。然而这些数据清楚显示 ER 分子伴侣能调节成熟的糖蛋白的形态,进而影响其功能。

三、钙释放的线粒体控制

线粒体能分离大的钙负载,因而是重要的胞内钙运输工具。由于线粒体在体外对 Ca^{2+} 敏感性低,因此认为线粒体不是胞质基质 Ca^{2+} 调节的参与者,但能调节胞液钙。然而, Rizzuto 和 Pozzan 及其他研究者已证实线粒体位于 IP_3R 离子通道的孔附近 (Science,

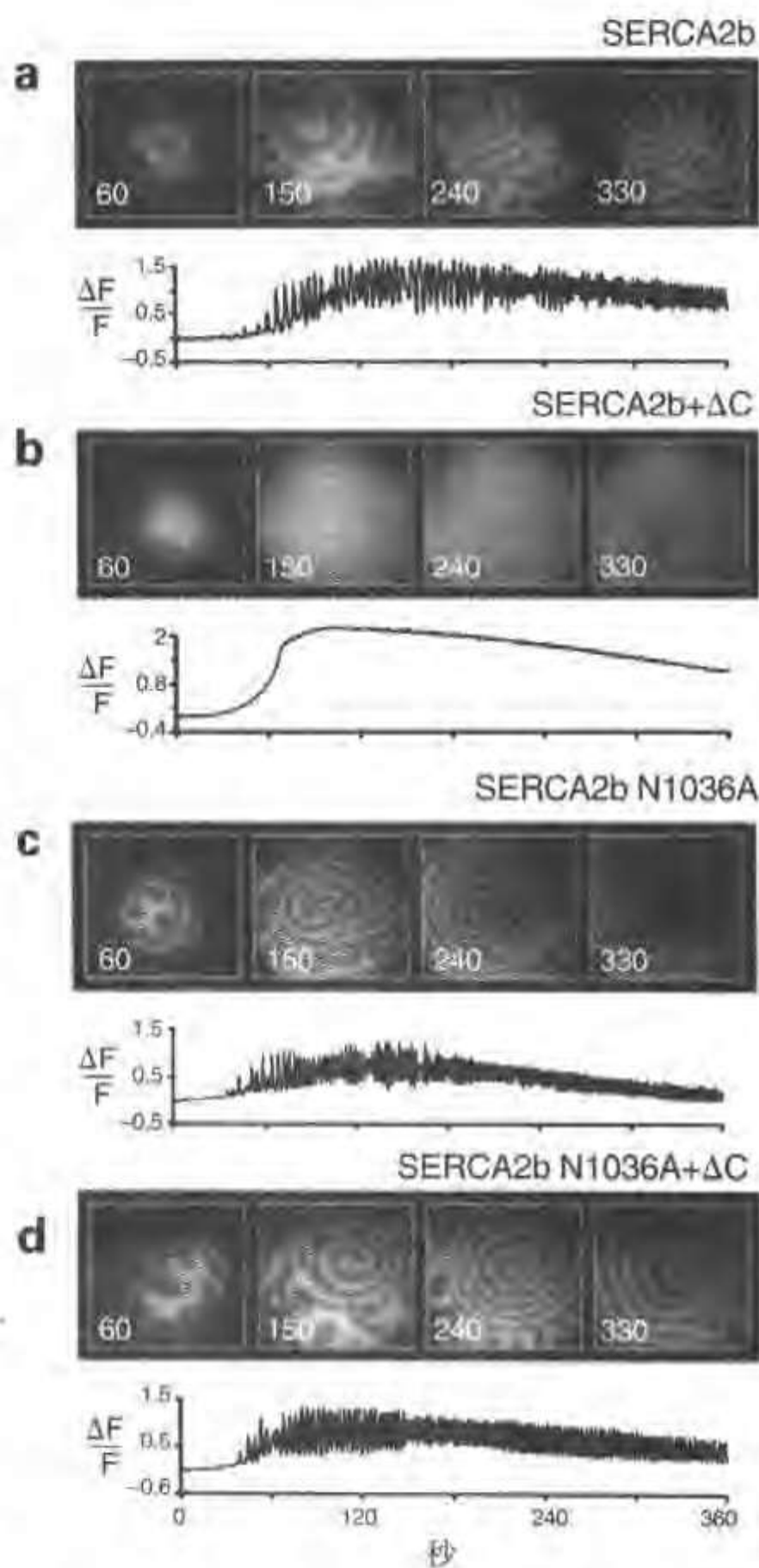


图 11-4 当与 SERCA2b 共表达时, ΔC 抑制 Ca^{2+} 震荡, 但与 SERCA2b N1036A 突变体共表达时 ΔC 不抑制 Ca^{2+} 震荡。a, b. 在 SERCA2b 过表达的卵母细胞, 300 nmol/L 左右的 IP_3 诱导的钙波活动与 SERCA2b + ΔC 共表达的卵母细胞钙波活动的比较。c, d. 在 SERCA2b N1036A 过表达的卵母细胞, 300 nmol/L 左右的 IP_3 诱导的钙波活动与 SERCA2b N1036A + ΔC 共表达的卵母细胞钙波活动的比较。上图显示在指定的时间点采集的钙波活动的共聚焦图像 ($745 \mu m \times 745 \mu m$), 图下方的曲线表示荧光强度随时间变化的函数。可以看出 SERCA2b 残基 N1036 的突变产生的一种蛋白质不再对 ΔC 共表达产生反应, 而与 SERCA2a 相类似

1993; 262:744; J Cell Biol, 1994; 126:1183)。位置相近使线粒体比胞液其他成分能感觉更大的钙浓度, 因此有关线粒体因不敏感而不能主动参与钙信号的经典结论不再有效。线粒体把钙摄取和钙流出通路隔离开来, 钙摄取由膜内外的离子电化学梯度驱动, 分离到的线粒体的钙则通过独特的流出通路返回至胞液(钙循环)。通过 SERCA 对钙波活动引起的钙摄取使人想到线粒体对钙信号动力学的钙摄取有潜在关系。假定由于 IP_3 结合 IP_3R 的钙依赖性, 线粒体钙摄取将影响细胞内钙释放。发现如把外源性氧化线粒体底物注入到蟾蜍属卵母细胞内, 将加强搏动的再生的钙波活动以及增加钙波波幅、速度和波间间隙期(图 11-5), 而且通过氧化底物而使线粒体获能将增加线粒体的膜电位。因为 ATP 产物和线粒体钙摄取物均受线粒体电位驱动, 所以区分哪些机制影响钙波活动是十分重要的。已经发现抑制线粒体合成酶(通过注射抑制剂寡霉素)对钙波活动没有什么影响。另外, 获能的线粒体对钙波活动的影响可以用 ATP 注入到卵母细胞来模拟, 因此 ATP 产物不可能引起钙波活动的同步。然而, 丙酮酸盐或苹果酸盐的影响可以用钌红来阻滞, 它通过线粒体来抑制钙摄取, 这样增加的钙而非 ATP 产物对 IP_3 诱导的钙波活动进行调节。推测电位驱动在线粒体钙摄取在调节 IP_3 诱导的钙释放中起主要作用。Simpson 和 Russell 的报道也认为星形胶质细胞的线粒体在钙波放大中起重要的调节作用(J Biol Chem, 1996; 271:33493; J Biol Chem, 1997; 272:22654)。线粒体调节钙波活动的能力归因于下面几个因素: 首先, 线粒体钙分离增加耽搁了 IP_3R 的最初兴奋, 从而降低震荡的频率。第二, 线粒体钙流出增加了单个钙波的衰退时间, 延长 IP_3R 的抑制; 第三, 线粒体增加了 IP_3R 释放 Ca^{2+} 的数量, 可恢复的 IP_3R 密度增加也降低了邻近 IP_3R 之间的扩散时间, 因而增加波速。

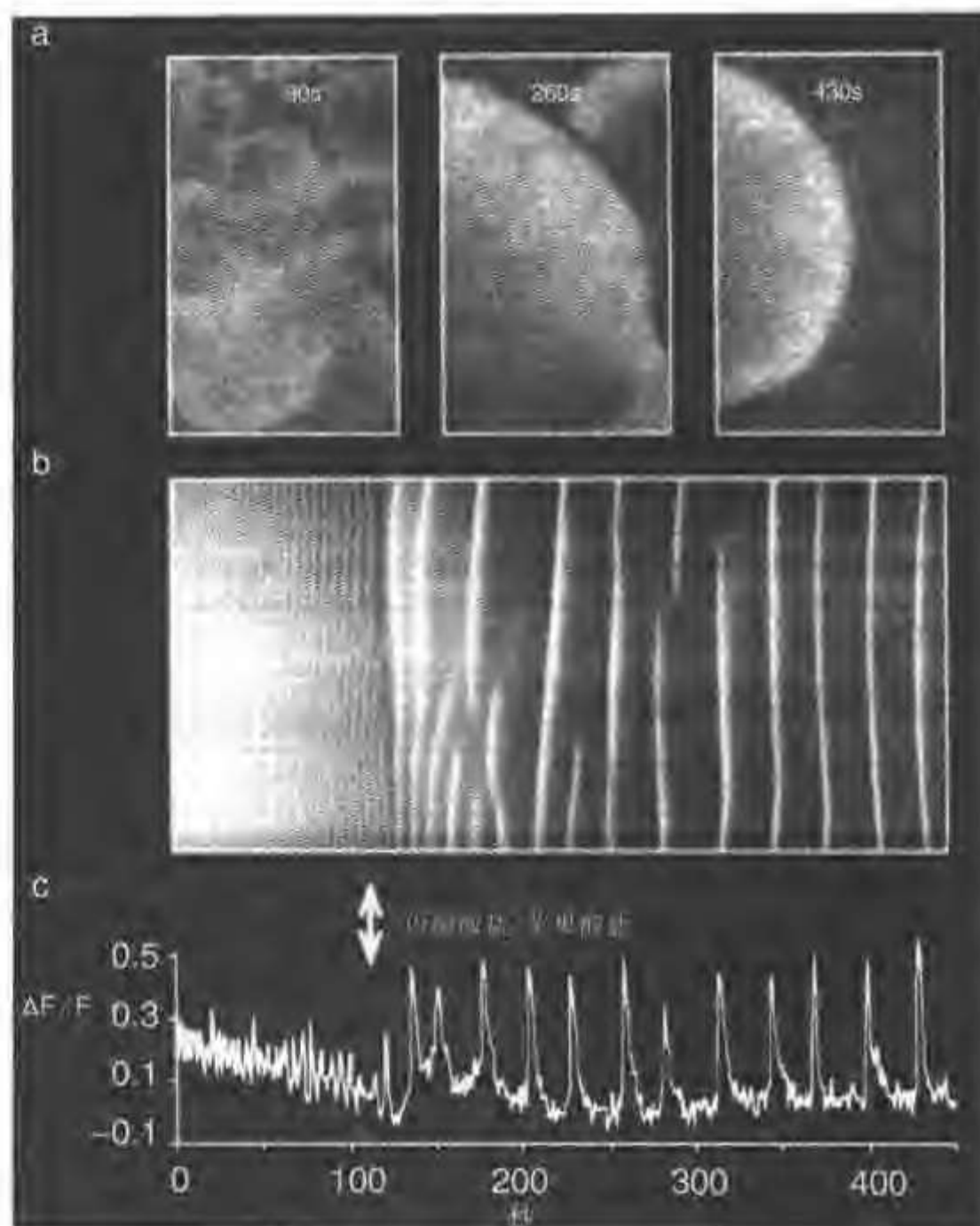


图 11-5 线粒体底物使 IP_3 诱导的钙波活动同步。该图像是在终浓度约 $5 \mu\text{mol/L}$ 的 IP_3 注射入卵母细胞后 1 min 采集的。a: 共聚焦图像大小为 $429 \mu\text{m} \times 726 \mu\text{m}$ (130 像素 \times 220 像素)。b: 在约 10 mmol/L 丙酮酸盐/苹果酸盐注射(箭头表示)前后观察到的全部 450 幅图像的时间叠加(temporal stack)。该图像(450 像素 \times 220 像素)是通过将 450 幅单个图像(1 像素 \times 220 像素)叠加形成。c: 记录的平均荧光强度随时间变化曲线。强度表示为 $\Delta F/F$, 代表(峰值荧光强度-静息荧光强度)/静息荧光强度(引自 Jouaville LS et al. Nature, 1995; 377: 438)

第三节 蟾蜍属卵母细胞系统的实际操作方法

(一) 手术

雌青蛙麻醉后放入冰水浴中大约 20 min, 手术应在下一个 20 min 内进行, 因为一些青蛙在麻醉后

60~90 min 后出现微小的反射活动。一旦麻醉,青蛙从冰水浴中拿出,腹部向上放入冰床,铺巾后只暴露腹部。为防止穿透内脏,用 15 号刀片切开 10~15 mm 的切口,切开时用组织镊抓住皮肤。切口切开后,用组织镊抓住 1 mm 厚的腹肌。腹肌轻轻提起,切开 15 mm 的切口,暴露卵母细胞囊。切口不能做得太小(小于 10 mm)是很重要的,因为不仅取卵母细胞困难,而且还容易使之受损。轻轻拉住囊腔,直至暴露 1~2 个叶,叶用剪刀分离并立即把它放入盐水中浸泡。把里面的囊腔仍放回腹腔,缝合肌肉和皮肤。在手术过程中维持麻醉效果是很重要的,然而绝对无菌是不必要的,因为蟾蜍属能分泌一种自然的抗生素。首先用酒精棉球消毒腹部,在手术中,把手术器械浸在酒精中,在随后的手术中青蛙仍被浸泡在冰水中,手术后移去冰桶,使青蛙逐渐恢复至 17℃,并放至一个隔离箱 4~5 d 以便康复。在手术之前至少要有 2~3 个月以确保动物的长期健康。最好把青蛙放入大箱中,对于手术康复或者刚买的青蛙应放置一个小箱里,最关键的是要有清洁的水,水箱用经过两次过滤的自来水灌满。水温在 17℃,水要不断地更换和循环。在用冷冻的牛肝喂后一周至少要换水 3 次。

(二) 卵母细胞的去囊过程

卵母细胞被一层囊泡细胞包绕,用微电极很难穿通。我们运用手工除囊泡的方法,虽然乏味,但这种方法比用酶消化法更少损伤细胞。简单地说,把 V、VI 期的卵母细胞从囊袋中释放出来,用一把钝镊放在与目标卵母细胞相连的区域附近,第 2 把镊子撕开囊腔,以使卵母细胞通过切口能游离。更详尽的方法来自于 Smith 和他的同事们的研究成果 (Methods in Cell Biology Vol.36, Academic Press, Inc, San Diego, 1991, 45),这个方法能成功分离 90%~95% 的细胞,这对大多数实验是足够了。剩下的细胞也可以用 Miledi 描述的方法分离出来,简要地说,盖玻片用多聚赖氨酸挂胶,把手工剥囊的卵母细胞在无细胞外钙溶液中孵育 15~30 min,接着把卵母细胞转至盖玻片上,在溶液中用一把钝镊顺着玻璃表面翻动,全部过程最好用模糊照明观察。总之,卵母细胞在手术当天要去囊,把健康去囊的卵母细胞和受损的、死亡的及不健康的卵母细胞分开是相当重要的。最初 24 h 检查和分类卵母细胞 2~3 次,每一次都要放在新鲜的培养基里,培养液里含有 50% L-15 培养基 (Gibco, BRL) 加有抗生素,并每日更换,虽然青蛙之间有变异性,但把去囊的卵母细胞储存在 -17℃ 冰箱里,至少一周它们仍然有活性。

(三) 微电极注射

用标准的玻璃微电极可以注射卵母细胞。玻璃毛细管(直径 1.0 mm)用水平玻璃牵引器牵拉,尖端压成直径 10~12 μm 。较大的直径容易导致永久性细胞损害,注射用自动注射器在立体显微镜下进行,电极的尖端直接对准卵母细胞的中心,当电极慢慢降低时,卵母细胞表面形成直径约其 1/3 大的小凹。注射均在含 1 mmol/L 细胞外钙的生理盐水中进行,电极用 1 ml 注射器和 25 号针抽消毒的矿物油填满,电极应放在德拉蒙德 (Drummond) 金属的活塞 (Plunger) 上,并且排去尖端的所有空气,烘干电极以消除 RNA 酶是不必要的,只要戴手套就行了,运用同样的方法注射 mRNA、钙或膜电位指示剂或第二信使(如 IP_3)。

(四) 表达载体的构建和离体翻译

用蟾蜍属卵母细胞去表达外源性蛋白,它的 cDNA 应被亚克隆成蟾蜍属的 β -球蛋白表达载体。使用试剂并用 m7G (5') PPP (5'') 加帽,线性 cDNA 以 T7 启动子上合成, mRNA 在浓度 4.5~20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 DEPC 水中重新悬垂,并在 -80℃ 中储存。

(五) 蛋白表达水平的检测

根据 Otte 等改良方法 (Development 1990; 110: 461) 准备卵母细胞溶解剂来检测表达的蛋白质。整个卵母细胞被移至 1.5 ml Eppendorf 管,在冰 PBS 中洗脱,卵母细胞 5 个一批,每管不超过 10 个。用小的移液管把 PBS 完全吸除,卵母细胞在冰浴溶解缓冲液中搅匀,缓冲液中含蛋白激酶抑制剂。溶解在 Eppendorf 管中进行,它是带有一个电池操纵的手持匀浆器。溶解产物用 10 000 g 离心 15 s,上清倒入清洁试管中,小心不要妨碍顶端脂肪层或者沉淀物。沉淀物在缓冲液中第二次匀浆,用 10 000 g 离心 15 s。两种上清混合后于 5℃ 中 10 000 g 离心 1 h。离心的上清含有胞液成分,最好在 -20℃ 储存,为分离膜结合

蛋白,把沉淀在溶解缓冲剂中再次悬浮(含1% NP-40 去污剂),室温孵育15 min,用10 000 g 离心15 s,最后的沉淀丢弃。上清中含有从膜中成功抽提的蛋白质,蛋白表达水平用免疫印迹法测定。

相关的蛋白表达水平也可以用活体卵母细胞比较。卵母细胞融合目的蛋白及过表达绿色荧光蛋白(GFP)。用该技术可测定在同等 GFP 荧光水平下,是否 GFP 标记的 SERCA2a 和 GFP 标记的 SERCA2b 及对钙波活动的影响不同。在这个实验中,应用钙橙指示剂来测定钙波活动。

(六) 免疫荧光标记技术

蟾蜍属卵母细胞的荧光染色的两种基本方法是低温切片和封固载片固定,两种方法均把卵母细胞在3.7%多聚甲醛、0.1%戊二醛和3%蔗糖缓冲液中4℃固定2 h,蔗糖能使标本逐渐脱水,固定后继续用20%蔗糖及0.1 mol/L PB,4℃孵育2 h,Hausen 和 Riehesell 提倡低温切片方法在0.5 ml 丙烯酸管中包埋过夜(J Biol Chem, 1997; 272: 22654)。丙烯酸包埋的卵母细胞在干冰酒精中冷冻,切片20 μm 厚,温度在-20℃,冰冻切片样本很容易附着玻璃载玻片。第二种方法除了加0.4% Triton X-100 之外,其他和第一种方法一样。固定缓冲液里的去污剂渗透脂膜,允许抗体和溶液进入细胞内。

两种方法用同样的溶液进行免疫标记,对第二种方法来说,它只不过是孵育时间加倍。对第一种方法,用TBS液(含5%牛奶粉,10%马血清)孵育1 h,并没有阻断非特异结合。在封闭液里第一抗体孵育1 h,在用1×TBS(含0.1% Tween 20)冲洗第一抗体3次后,切片再用荧光团标记的二抗孵育1 h,二抗接着冲洗(15 min×4),封片。

(七) 共聚焦成像

共聚焦显微镜可以用作蟾蜍属卵母细胞的荧光成像工具。普通的荧光显微镜,虽然很敏感,但由于有离焦眩光从而降低成像质量和分辨率,对像蟾蜍属卵母细胞如此厚的标本,这确实是个大问题。共聚焦成像能消除眩光,并可进行光学切片,简单地说,共聚焦显微镜可以看作特殊的荧光显微镜,它以点激发和点探测为特征,激光束聚焦在标本上形成一个衍射限制点,从这一点上发出的荧光接着被收集和聚焦在点探测器上,通常为光电倍增管。为了收集穿过标本的全部光线,可通过移动标本而光束不动,或者用光束对样品扫描而样品不动来实现。共聚焦显微镜在xy平面上的空间分辨率是200 nm,而在z轴上则是400 nm。

(八) 细胞内钙波活动成像

将钙荧光指示剂250 μmol/L 钙绿1 溶液抽取50 nl 注射到卵母细胞内,最终染料浓度是12.5 μmol/L(假定卵母细胞的体积是1 μl),这么低的钙指示剂浓度并不能显著影响钙释放的动力学。在实验之前应该用钙荧光指示剂注入细胞内30~60 min,在较长时间后,卵母细胞开始把染料分离至亚室,把指示剂从胞质里清除出去。每次实验使用新鲜的荧光指示剂也很重要。在实验中,钙荧光指示剂在几个月储存后则降解,很有必要把它们分开在钙EGTA缓冲液和荧光团中储存。刚购买的指示剂马上使用高纯水配成1 mmol/L 的储备液。在-20℃中储存,同时不超过2个月。用倒置显微镜进行共聚焦成像实验,把卵母细胞放在一个灌满盐水的记录室,它有一个玻璃载玻片底端。放入载玻片后,卵母细胞稍微变扁平,形成一个平面以利于共聚焦成像,调整焦平面,可以获得最明亮荧光图像。使用10×物镜,这将导致含有卵母细胞最初30 μm 钙荧光的共聚焦切面和700 μm 的总卵母细胞直径。为了限制获得图像的大小,单个图像大小在256 像素×256 像素。获得的共聚焦图像不仅依赖于实验类型,而且依赖于共聚焦显微镜。当测量SERCA对钙波活动的影响时,发现以0.5 s 间隔收集的图像能够准确测量波周期和速度,钙流的钙释放动力学的精确估计则需要更快的图像,视频共聚焦显微镜(NORAN 仪器和Nikon TCM2000)可以成功获得快速数据。

(九) 钙波的分析 and 解释

当用IP₃注入IV期卵母细胞时,在观察到典型的缓慢重复的钙波后,接着释放整齐的钙波。正如上面所述,钙波的特点很大程度上受SERCA、CRT和线粒体活动的影响。

卵母细胞分成两类以供分析:出现重复的钙波和不出现重复钙波。在无重复钙波的卵母细胞中,测

量下列参数：波幅〔以荧光相对基础水平的峰改变量 (F/F) 定义)、半衰期 ($T_{1/2}$, 把胞液钙从峰值降到一半所需时间) (图 11-6)。当卵母细胞出现重复钙活动时, 把钙波波幅、周期和速度分开记录 (图 11-6, 图 11-7), 当重复波的频率最大时获得这些结果。还测量 $T_{1/2}$ 和波前缘的长度速度乘积 ($L \times V$) (图 11-6), 这个结果的度量单位是扩散常数, 并要和钙及与正反馈有关的催化剂有效扩散常数成正比。钙波的升高相也可以用从基本水平到波幅峰值的时间来测量, 此测量需要充分快速时间分辨率去记录这些活动, 例如单线扫描模式或者视频共聚焦显微镜。

控制钙信号的不同机制反应钙波的不同方面。在它的最简单方式里, 钙波表示在钙释放和钙摄取间的传导平衡, 除了传导遍及胞浆之外, 钙波精确类似于神经细胞和肌肉细胞里的动作电位传导。钙波的波形为我们提供信息来研究钙释放过程的动力学。钙释放由结合、泵和分离钙过程调节。钙波的波幅依赖于多种因素, 包括激活的 IP_3R 数目、通道开放的持续时间、钙储存的充填状态和钙分离过程的活动。总之, 衰退相由 IP_3R 通道灭活和钙摄取、结合和分离决定。

使用蟾蜍属卵母细胞作为研究钙信号的工具具有较多优点。它的体积大, 便于操作。卵母细胞的体积也允许钙信号的大规模成像。作为一个单一的细胞标本, 它的生理反应很容易和蛋白水平相关。当联合瞬时表达系统的内在优点时, 蟾蜍属卵母细胞是研究和探测钙信号基本分子机制的强有力及灵活的工具。

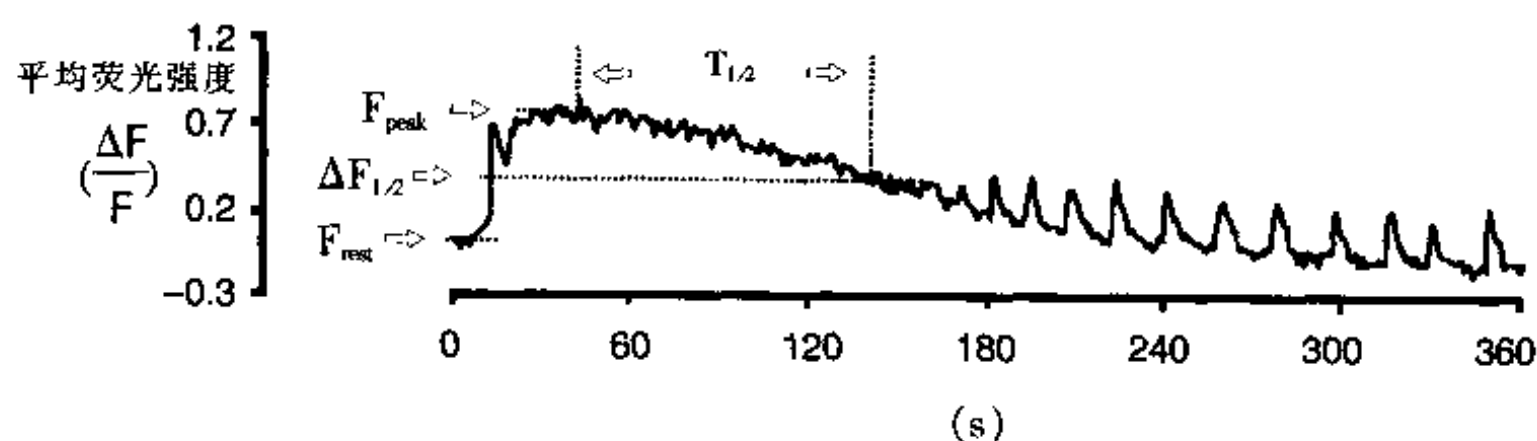


图 11-6 钙潮汐和重复性钙波的测量。曲线表示用 IP_3 刺激的卵母细胞平均荧光强度随时间变化的关系。静息荧光强度 (F_{rest})、峰值荧光强度 (F_{peak}) 和钙潮汐的半振幅 ($\Delta F_{1/2}$) 见平行点线。振幅衰减一般的时间 ($T_{1/2}$) 由纵行点线表示。类似的测量也在发生在 180~360 s 的每一重复钙波进行

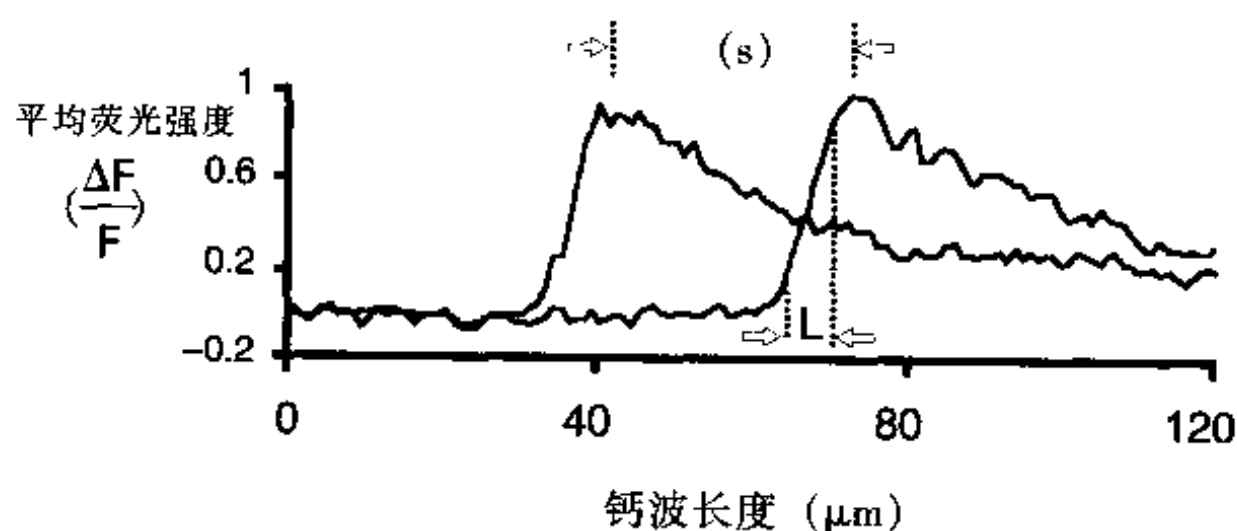


图 11-7 钙波长度速度乘积的测量。钙波强度图形的记录间隔 1 s。钙波的速度由该秒内传播的距离决定。长度定义为波前峰上升缘从 10%~90% 的距离。将 $GPII_2$ 和丙酮酸盐/苹果酸盐 (约 10 mmol/L) 注射到卵母细胞激发钙波活动。图像用 40×物镜采集

第十二章 细胞内 pH 及 pCa 测定

共聚焦显微镜技术是测量若干种离子浓度并显示其分布的有效工具,对焦点信息的有效辨别使在亚细胞水平显示离子分布成为可能。为产生这种有一定精度的显示,需要补偿细胞在光路、探针分布等方面固有的不均一性,一般用比率测量法完成此工作。荧光比量利用了比例探针对差光谱的敏感性来检测参数(如离子浓度),鉴于比例探针在一个波长的荧光性质以一种方式对参数敏感,其在不同的、良好分离的波长上的发射(或激发)必然是对参数不敏感、反向敏感或呈现不同的敏感性,两种波长的发射强度继而彼此区分,这样得出的比率使探针分布和浓度的不一致性以及系统几何学的不一致性得到标准化。为了得到有意义的资料,比值必须对照一个标准校准,此标准值常常为参数的一个定级变化。现代共聚焦显微镜以激光为光源,这样在激发荧光素的波长数上有了严格的限制,一些 H^+ 敏感的荧光素在接近于标准激光的发射波长上激发,但 Ca^{2+} 敏感的荧光素并不是这样。

本章描述用典型的现代共聚焦显微镜测量细胞内 pH 值 (pH_i) 及 pCa 值 (pCa_i) 的方法,这种显微镜包括一个能同时双激发和同时收集双发射的扫描头,标准模式下整帧的扫描时间为 1 s,减慢模式下为 2 秒,后者的像素驻留时间较长因而信噪比较高。同期双激发/双发射模式的操作需要 FITC/Texas-Red 滤镜模块,使两个发射波长在 560 nm 由二色镜分开,光源最好是混合气体氦/氢激光。 pH_i 测量所用荧光素为半萘荧光黄钙黄绿素乙酰甲酯 (seminaphthofluorescein-calcein acetoxymethyl ester, SNAFL-钙黄绿素 AM), SNAFL-钙黄绿素 AM 的酸性组成成分与 FITC 荧光素(激发波长 488 nm,发射波长 535 nm)有类似的光谱性质,而其碱性组成成分则与 TRITC 和 Texas 红的混合物有类似性质(激发波长 540 nm,发射波长 620 nm)。 pCa_i 测量所用荧光素为钙绿和 Fura-红的混合物,它是以 Lipp 和 Niggli 首次描述的 Fluo-3 和 Fura-红混合物为基础设计的。SNAFL-钙黄绿素加载容易,细胞内保留好,在当今大多数常用硬件上无需做任何调整即可使用,因而是共聚焦显微镜测量 pH_i 的较好选择。而对显示 Ca^{2+} 结合的光谱转换缺乏现成的指示剂,必须使用钙绿/Fluo-3 和 Fura-红染料混合物,由可见光激发。

一、材料

- (1) SNAFL-钙黄绿素 AM\钙绿 AM\Fura-红 AM, 钙校准试剂盒 1。
- (2) Pluronic F-127 从 Molecular Probes 购买。
- (3) 伊屋诺霉素 (Ionomycin) 从 Calbiochem (La Jolla, CA) 购买。
- (4) 二甲基亚砜 (DMSO) 和尼日利亚菌素 (nigericin) 从 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) 购买。
- (5) 胰酶/EDTA。
- (6) α -MEM 培养液。
- (7) 含 20 mmol/L HEPES 的 α -MEM (MEM-HEPES, pH7.36)。
- (8) 热失活的胎牛血清(FBS)购自 Gibco(Canadian Life Technologies, Burlington, ON, Canada),所有的 MEM-HEPES 培养液必须是无 $NaHCO_3^-$ 离子的。
- (9) 无氨基酸的 MEM-HEPES 或在表 12-1 和表 12-2 中显示的缓冲液用来作染料加载。
- (10) 包含尼日利亚菌素的校准溶液。5 种溶液的 pH 值分别为 6.4、6.7、7.0、7.3、7.6,由添加了 10 μ mol/L 尼日利亚菌素的 K^+ -MEM-HEPES 制成。

表 12-1 染料加载 (A)、pH_i 测量 (B)、校准 (C) 所用缓冲液组成

组成成分	A	B	C
NaCl, mmol/L	118	118	0
KCl, mmol/L	5.3	5.3	123.3
CaCl ₂ , mmol/L	1.8	1.8	1.8
MgSO ₄ , mmol/L	0.8	0.8	0.8
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, mmol/L	1	1	1
HEPES, mmol/L	20	20	20
D-Glucose, mmol/L	10	10	10
Phenol red, mmol/L	0.03	0.03	0.03
Lipoic acid, mmol/L	1	1	1
Sodium pyruvate, mmol/L	1	1	1
Set of amino acids	-	+	+
Set of vitamins	+	+	+
Fetal bovine serum, %	0	3	0
Nigericin, μmol/L	0	0	10

表 12-2 染料加载 (A)、pCa_i 测量 (B)、校准 (C) 所用缓冲液组成

组成成分	A	B	C
NaCl, mmol/L	140	140	-
KCl, mmol/L	4	4	100
CaCl ₂ , mmol/L	1	1	-
MgCl ₂ , mmol/L	1	1	-
HEPES, mmol/L	10	10	-
Glucose, mmol/L	10	10	-
Ionomycin, μmol/L	-	-	2
pH	7.2	7.2	7.2
MOPS, mmol/L	-	-	10
EGTA/CaEGTA, mmol/L	-	-	0-10
Pluronic F-127, 0.02%	+	-	-

二、方法

(一) pH_i 测量

以下为接近铺满的 MDCK 细胞优化后的实验条件, 每种细胞类型的条件需经试验确立。

(1) 用 5 μmol/L SNAFL-钙黄绿素 AM 在无血清及氨基酸的培养液中加载细胞 30~40 min。更高的染料浓度和 (或) 更长时间的加载将导致染料的区室化, 从而可能导致测量误差。加载前, 盖玻片用无血清 α-MEM-HEPES 冲洗两次, 然后在室温下在含 5 μmol/L SNAFL-钙黄绿素 AM 的无氨基酸 α-MEM-HEPES 中孵育, 荧光素用无水 DMSO 配成储存液, 可在使用前临时配置, 也可以 1 mol/L 浓度 -20℃ 保存, 最后培养液中 DMSO 浓度应不超过 0.1%。对未铺满的细胞, 加载的时间和温度非常重要, 为防止染料区室化, SNAFL-钙黄绿素浓度为 5 μmol/L 时, 室温下加载时间应不超过 40 min, 细胞也可在 37℃ 下加载, 但时间应缩短到 30~35 min, 对层叠的细胞加载时间可以稍微延长。可不用 Pluronic F-127 辅助加

载 SNAFL-钙黄绿素,但对其他一些细胞类型这可能是必要的,加载 Ca^{2+} 探针时需要 Pluronic F127。

(2) 在 2% 血清 20 $\mu\text{mol/L}$ HEPES 的 α -MEM 中孵育细胞 15~20 min,使细胞恢复,然后用 K^{+} -MEM-HEPES 洗涤细胞两次。对任何 pH_i 或 pCa_i 测量或校准都不要使用抗生素,只在校准培养液中用 KCl 代替 NaCl。

(3) 将细胞置于显微镜下,选择倒置显微镜,因其适用于多种为显微镜设计的细胞培养室,如 Bio-Rad MRC 1024 直立式显微镜。将贴附细胞的盖玻片放置在 60 mm 培养皿中,加 2% FBS 的 MEM-HEPES 培养液,细胞图像(每视野 20 个细胞)由 Zeiss Plan-Neofluar 物镜(40 \times)收集,测量可在室温或 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行。

(4) 同时用 488 nm 和 568 nm 激光束、FITC/Texas Red 滤镜装置(如 Bio-Rad MRC 1024 中的 K1 和 K2)和共聚焦显微镜的同时双激发和同时双发射记录性能,从绿色通道(激发波长 488 nm,发射波长 615 nm)和红色通道(激发波长 568 nm,发射波长 615 nm)采集细胞内 SNAFL-钙黄绿素的发射荧光,确保两个通道的增益范围覆盖两个发射的预期动态范围,亦即当最弱发射仍在记录时,最强发射不能使光电倍增管饱和,在 Bio-Rad MRC 1024 上可以通过手动调节增益控制(“自动”增益控制在 OFF 位置)以及共聚焦孔(针孔)完成。进行 pH_i 测量时对 Bio-Rad MRC 1024 光电倍增管 1 和光电倍增管 2 的 pH_i 成像设置为:①共聚焦针孔直径,全开;②增益控制,关;③增益控制,手动;④灰度控制,手动;⑤中心密度滤镜 no.2(中心密度为 1.5;3%透明度);⑥扫描速度 1 帧/s。测量必须进行内部校准。

(5) 每次试验结束后立刻在与 pH_i 测量相同的显微镜工作条件下校准 pH_i ,使用新一批 SNAFL-钙黄绿素 AM 加载的细胞,用 K^{+} -MEM-HEPES 平衡和冲洗两次,用所需 pH 值的含 nigericin K^{+} -MEM-HEPES 注满培养皿并在进行校准测量前孵育 3~5 min,对所有的 pH 值重复此操作。一般细胞浸于 pH 值为 6.4、6.7、7.0、7.3、7.6 的含 nigericin K^{+} -MEM-HEPES 中,从细胞层的不同区域收集一系列图像,每个 pH 校准点收集至少 5 对不同的图像。先用酸性溶液最小化细胞气泡,每个校准测量之间,用缓冲液中冲洗样本两次并平衡 3~5 min 来准备下个点的校准。一些细胞系对培养液条件的变化非常敏感(如 pH 的不同),不能在完整的校准过程后保持良好活性,这种情况下建议在相同条件下加载一些较小的盖玻片(可用 Petri 皿),每个 pH 点用一两个盖玻片进行校准而不是用一个盖玻片对所有点进行校准。所有的实验和校准都要在 3 h 内结束,否则必须对新的细胞进行加载。

(6) 通过进行图像之间的计算区分得到绿色和红色发射的比例,然后一般用一个常数相乘,任何可在图像资料上作计算操作的软件都可以完成此工作,用校准资料为每个实验产生一个标准 pH 曲线。

(7) 确保 SNAFL-钙黄绿素 AM 的 pH 范围在 6.2~7.8 之间,因为在此范围外染料难于进行校准。 pH_i 图像的质量和分辨率受显微镜工作条件限制,样本固位后用快速扫描模式(每帧 1/4 s)聚焦以使图像漂白减到最低,一般用每帧 1 s(512 线)的激光扫描速度记录图像,两个通道的共聚焦针孔都全开,手动调节增益控制。扫描增益打开时,即使在相同的灰度控制手动设置下,525~614 nm 发射图像与 615 nm 图像的背景噪音水平也有显著的不同,这是因为增益设计自动提高了光子/输出电压比。 pH_i 校准可参考 Thomas 等的高 $[\text{K}^{+}]/\text{nigericin}$ 方法。钙绿有 FITC 类似的光谱性质(激发波长 506 nm,发射波长 530 nm),其荧光强度随 Ca^{2+} 浓度提高而提高。钙绿与 Fluo-3 有相同的光谱性质,但 Molecular Probes 显示钙绿的亮度是 Fluo-3 的 5 倍,而且漂白速度慢的多。Fura-红是比量染料,在 440 nm 和 490 nm 激发,在 660 nm 有一个巨大的 Stokes 发射波长位移,不同寻常的是其发射强度随 Ca^{2+} 浓度的提高而降低。

(二) pCa_i 测定

以下为鸡胚视网膜色素上皮细胞最优化后的实验条件,每种细胞的条件必须通过实验建立。

(1) 用钙绿(8 $\mu\text{mol/L}$)和 Fura-红(5 $\mu\text{mol/L}$)的乙酰甲酯混合物加载细胞 30~40 min,加载缓冲液中含有 0.02% 的 Pluronic F-127(每毫升染液加 1 μl 20% 的储藏溶液),更高的浓度和(或)更长的孵育时间将导致染料的区室化,而导致测量的误差。每种细胞类型的加载条件应在实验中建立,使在整个 pCa_i 预期光谱中染料组成都有良好的图像质量,必须记住 Fura-红图像随 pCa_i 增高而变暗,而钙绿

图像则变亮。已报道的加载乙酰甲酯混合染料 Fluo-3 与 Fura-红的组成比例从 (3:4) $\mu\text{mol/L}$ 、(1:10) $\mu\text{mol/L}$ 、(50:100) $\mu\text{mol/L}$ 到 (100:300) $\mu\text{mol/L}$ 不等, 加载钙绿与 Fura-红的比例为 8.3:4.6。

(2) 在含 2% 血清和 10 mmol/L HEPES 的 α -MEM 中孵育细胞 15~20 min, 使细胞复原。

(3) 放置细胞于显微镜下。选择倒置显微镜, 因其适用于为显微镜设计的多种细胞培养室。使用 Bio-Rad MRC 1024 直立显微镜, 将细胞贴附的盖玻片放置于 60 mm 培养皿的测量缓冲液中 (见表 12-2), 细胞图像 (每幅 20 个细胞) 用 Zeiss Plan-Neofluar 物镜 (40 \times) 收集, 测量可在室温或 37 $^{\circ}\text{C}$ 下进行。

(4) 用 488 nm 激光束、FITC/Texas Red 滤镜装置 (如 Bio-Rad MRC 1024 的 K1 和 K2)、共聚焦显微镜同时双发射记录性能, 从绿色通道收集细胞内的钙绿发射 (488 nm 激发, 525 nm 发射), 从红色通道收集 Fura-红发射 (568 nm 激发, 615 nm 发射)。确保两通道的增益范围覆盖两种发射的预期动态范围, 亦即当最弱发射仍在记录时, 最强发射不会饱和光电倍增管, 当检测混合物中染料比例时也必须考虑到此问题。系统校准在 Bio-Rad MRC 1024 上用手动调节增益控制 (“自动” 增益控制位于 OFF) 和共聚焦孔 (针孔) 完成。

(5) 每次实验结束后立刻在与 pCa_i 测量相同的显微镜工作条件下校准 pCa_i , 使用新一批染料混合物加载的细胞, 用适当的 Ca^{2+} 缓冲液平衡并洗涤两次。基于 Grynkiewicz's 方程的校准过程不适用于两种染料乙酰甲酯混合加载的细胞, 即使对 Grynkiewicz 方程进行修正以适合两种染料不同的 Ca^{2+} K_d 值, 其适用性仍有很大的问题, 因而需要实施一种类似于 pH_i 测量所用的校准方法。根据 Molecular Probes 校准试剂盒, 准备几种 Ca^{2+} 浓度逐步升高的缓冲液来作校准测量。Molecular Probes 出售两种 Ca^{2+} 缓冲试剂盒 (产品编号: C-3008 和 C-3009), 每一 pCa 点使用新的相同条件下加载的细胞, 先用适当的 Ca^{2+} 缓冲液洗涤, 然后放置在含 2 $\mu\text{mol/L}$ ionomycin 的相同缓冲液中, 在一个给定校准点应收集几个不同的图像对。用含 Ca^{2+} 离子载体及 ionomycin 的不同 Ca^{2+} 浓度的系列溶液注满培养皿, 测量加载染料的 Ca^{2+} 通透性细胞在级差 $[\text{Ca}^{2+}]$ 溶液中的一系列值, 产生每个实验的 pCa_i 标准曲线, 对所有钙浓度重复操作。一般每个 pCa_i 校准点自细胞层的不同区域应采集至少 5 个不同的图像对, 每个校准测量之间, 用缓冲液洗涤样本 2 次, 并平衡 3~5 min 来准备下一个点的校准。

(6) 通过进行图像之间的计算区分得到绿色和红色发射的比率, 然后一般用一个常数相乘, 任何可在图像资料上作计算处理的软件都可以完成此工作, 用校准资料为每个实验产生一个标准 pCa_i 曲线。由于共聚焦显微镜可以成像统一的单一光学切面, 在用非比率荧光素测量厚组织的 pCa_i 时取得了成功。最大记录速度 (时间解析度) 受扫描速度限制 (一般为 512 线/s), 当离子变化包含极快的细胞信号转导模式时, 标准的共聚焦显微镜需用很长时间来收集质量较好的全视野图像, 时间解析度可以通过降低图像帧幅来提高。在一些应用中可以只有一线, 单线扫描模式的共聚焦显微镜可以在一快速扫描的单线上显示非常快的离子浓度变化 (毫秒范围), 裂隙扫描共聚焦显微镜可以提供离子变化的视频-比率图像的选择。只有在探针位于我们希望的位置时才能收集到有生理学意义的资料, 所以用荧光探针加载细胞时应非常小心, 探针浓度、细胞密度、加载时间、温度、血清及培养液中特定氨基酸的存在与否及各种刺激都将影响细胞加载 AM 类染料。过加载的探针将会立刻区室化, 并且大部分加入细胞溶胶的探针最终都会区室化, 意味着它们消失在不同的细胞腔室如线粒体、内质网及各种细胞器中, 这将导致测量误差。不幸的是并没有细胞加载的固定方法, 染料加载条件必须依每个试验设置面设计。首先检查血清的存在与否对加载效率和加载染料区室化的影响, 然后要试验加载的温度, 一些细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下可以很快、很好地加载, 而另一些细胞则需要在较低的温度下用较长的时间以加载均匀, 为保证染料能均匀地渗入较厚的标本 (如多层折叠的上皮或组织切片), 可以考虑在冰箱中孵育。细胞间酯酶的存在与否也会影响染料加载标本的时间和染料浓度。如果需要在低于室温下孵育, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 加温标本 20~30min 是必要的。通常在染料溶液中加入 1~4 $\mu\text{l/ml}$ 的 Pluronic F-127 辅助加载 AM 类染料。最后, 细胞通过泵出机制来排出染料, 据报道, 加入 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 的丙磺舒 (Sigma) 可以抑制 Fluo-3 的排出。

第十三章 钙调蛋白依赖蛋白激酶的激活

在细胞内，一类 Ca^{2+} 调节蛋白可以将细胞内自由 Ca^{2+} 水平的短暂和局部变化转变成细胞的特异性反应。其中一些蛋白，例如蛋白激酶 C 和 Ca^{2+} 依赖蛋白激酶（calcium-dependent protein kinase, CDPK），与 Ca^{2+} 结合后被激活（图 13-1）。而另外一些酶则不受细胞内 Ca^{2+} 受体分子的直接调控，更多通过钙调蛋白（CaM）表现出来。钙调蛋白是一种真核细胞生存必需的 Ca^{2+} 结合蛋白。它是一种小分子量蛋白质，包括了四个进化上高度保守的 Ca^{2+} 结合 E-F 臂。CaM 有两个结构域：①N 端结构域，即 E-F 臂 1、2，脊椎动物 CaM 的第 1~74 位氨基酸，包含一对低亲和力 Ca^{2+} 结合位点；②C 端结构域，即 E-F 臂 3、4，脊椎动物 CaM 的第 83~148 位氨基酸，包含一对高亲和力 Ca^{2+} 结合位点。这两个结构域被一条约 8 个氨基酸大小的接头（第 75~82 位氨基酸）连接起来，使 CaM 分子形成一种哑铃形的空间构象。CaM 一旦与 Ca^{2+} 结合，其空间构象将发生巨大的改变，钙调蛋白的空间构象从一种闭合状态改变为一种比较开放的形状，在前一种状态下，它的两个结构域朝向分子中央，通过重新安排分子内的 α 螺旋，使分子形状变的较开放，易于结合 Ca^{2+} 。与 Ca^{2+} 结合后，钙调蛋白的每个结构域中一段突出的疏水片段被暴露出来，这时它能以高亲和活性与各种受 CaM 调节的酶类结合并激活之。

有几种酶类的激活方式都依赖于 Ca^{2+} 的存在，包括蛋白激酶、钙调磷酸酶、磷酸二酯酶、 Ca^{2+} 泵和一氧化氮合酶家族，这些酶是机体基本生物过程信号途径的关键部分，例如细胞生长、分化、变形和迁移。值得注意的是除了 CaM 依赖磷酸酶和激酶以外，CaM 依赖磷酸二酯酶和腺苷酸环化酶，通过 cAMP 依赖蛋白激酶途径调节有效环状核苷酸水平，进而间接使蛋白磷酸化。因此，CaM 处于信号传导通路中的一个极其重要的十字路口，在这一点， Ca^{2+} 信号被转化为特定蛋白的磷酸化反应。CaM 在细胞信号传递中的重要作用为我们提供了不同方法，去解释蛋白质怎样通过 Ca^{2+} 依赖途径调节其下游的效应器。

许多早期的关于 CaM 激活机制生化研究结果并不一致。从定比为 1:1 的化学复合物中 CaM 依赖酶之间的竞争结合实验结果可以看出，CaM 的一个结合位点可与不同的酶结合。CaM 的亲合力标记和定位诱变实验结果，显示不同的酶需要与 CaM 的不同部分结合后才能完全激活。其他的诱变实验结果证明 CaM 两个结构域之间的特异的连接肽在功能上可以承受大

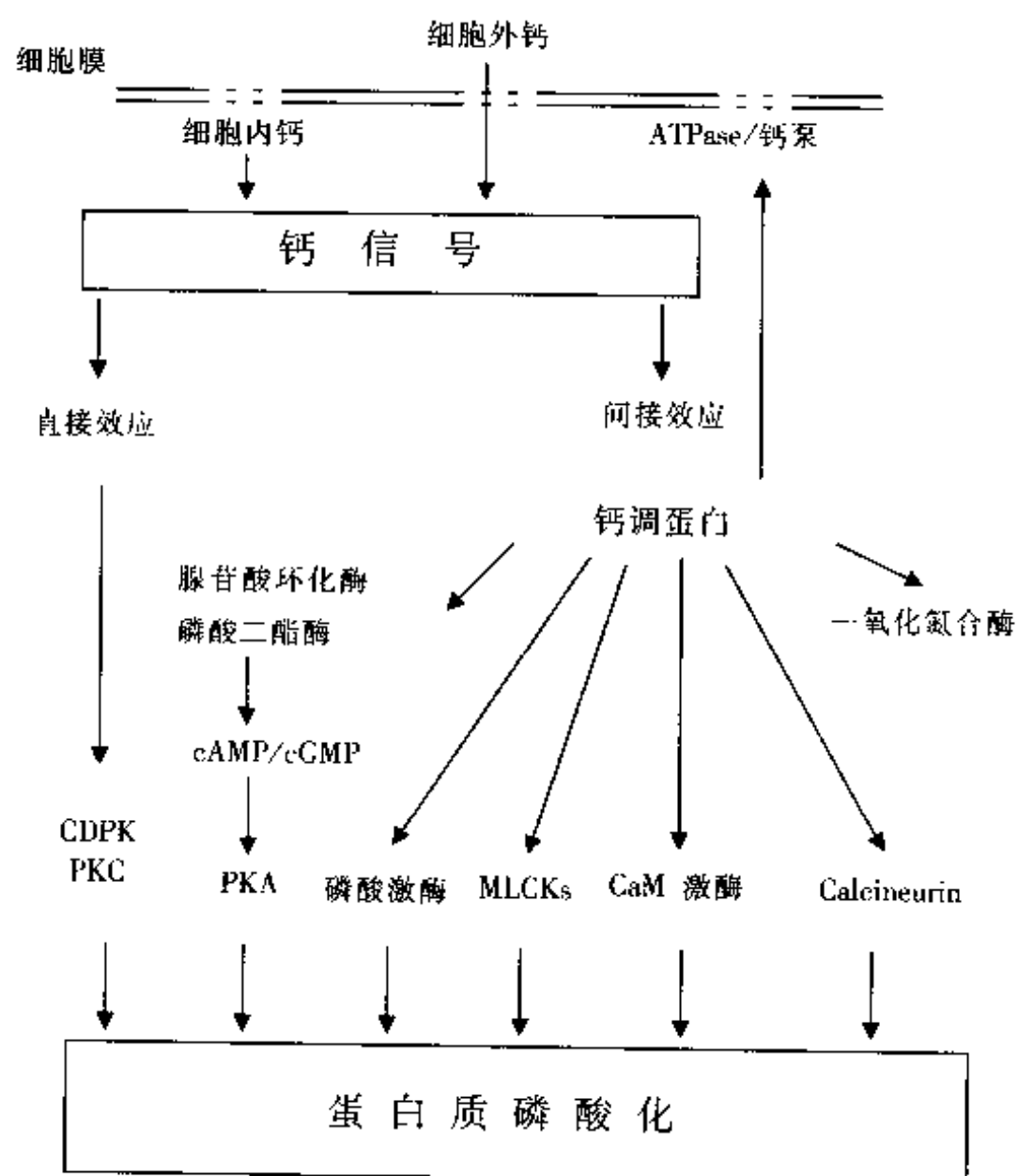


图 13-1 钙信号转入细胞蛋白磷酸化的机制 着重于钙结合蛋白质钙调蛋白对信号转导和其他细胞内过程的关键作用

的改变。但是这些实验都不能明确 CaM 中直接负责酶活性调控部分的空间结构。这一章阐述了几种关于 CaM 激活 CaM 依赖酶的分子机制。

第一节 钙调蛋白依赖蛋白激酶

一、钙调蛋白激酶

钙调蛋白通过调控细胞内的各种信号蛋白将 Ca^{2+} 信号转化成相应的生化反应。因此，在弄清钙调蛋白反应机制之前，有必要了解受钙调蛋白调节的蛋白激酶的结构和功能。CaM 依赖的蛋白激酶家族是历来被研究最多的一个家族，因此，也是目前受钙调蛋白调控的酶类中了解最清楚的一类。最早被发现的一种蛋白激酶——多聚磷酸化酶激酶，是细胞内葡萄糖代谢的一个关键调控子，也是最早被发现的可以被 Ca^{2+} 和 CaM 激活的酶类之一。然而，与磷酸化酶激酶不同的是，大多数的 CaM 依赖酶类在 K_d 为 10^{-9} ~ 10^{-7} mol/L 时可以自由地与 CaM 分离，因此，这些酶更适合研究 CaM 的功能。它们包括脊椎动物骨骼肌和平滑肌肌凝蛋白轻链激酶 (skMLCK 和 smMLCK)，其在细胞收缩和移动过程中起重要作用。它们包括钙调蛋白激酶 I 和 II (CaMK I 和 CaMK II)，这两种酶主要在中枢神经组织中表达，可能参与学习和记忆的形成；钙调蛋白激酶 IV 在多种组织中表达，参与调节 RNA 转录；钙调蛋白激酶 III 是细胞蛋白翻译系统的一部分。因此，这些具有不同功能的信号分子组成了钙调蛋白依赖蛋白激酶家族，但是，它们都需要被钙调蛋白激活后，才具有完全活性。了解钙调蛋白激酶的结构和功能不但可以更好地了解这些酶，而且可以更好地了解钙调蛋白对它们的调节机制。

钙调蛋白激酶的一级结构具有高度的同源性。实际上，只用钙调蛋白激酶催化结构域的蛋白序列的不同就可以将它们分成进化上的不同家族。钙调蛋白激酶的激酶结构域在 C 端由 20~30 氨基酸组成的长调控结构域之后，该结构域可分为两部分：一部分为 N 末端的自动抑制区，可以使全酶保持在非活性状态；另外一部分与前者相接，为 CaM 结合区。对几种钙调蛋白激酶 C 末端进行限制性蛋白水解和缺失突变证实：几种钙调蛋白激酶的自动抑制区中有一段同源序列，它对抑制全酶活性起关键性作用。这一段 2~5 个氨基酸组成的关键的有自动抑制功能的序列与可抑制 PKA 活性的 PKI 区域序列相似。非常有趣

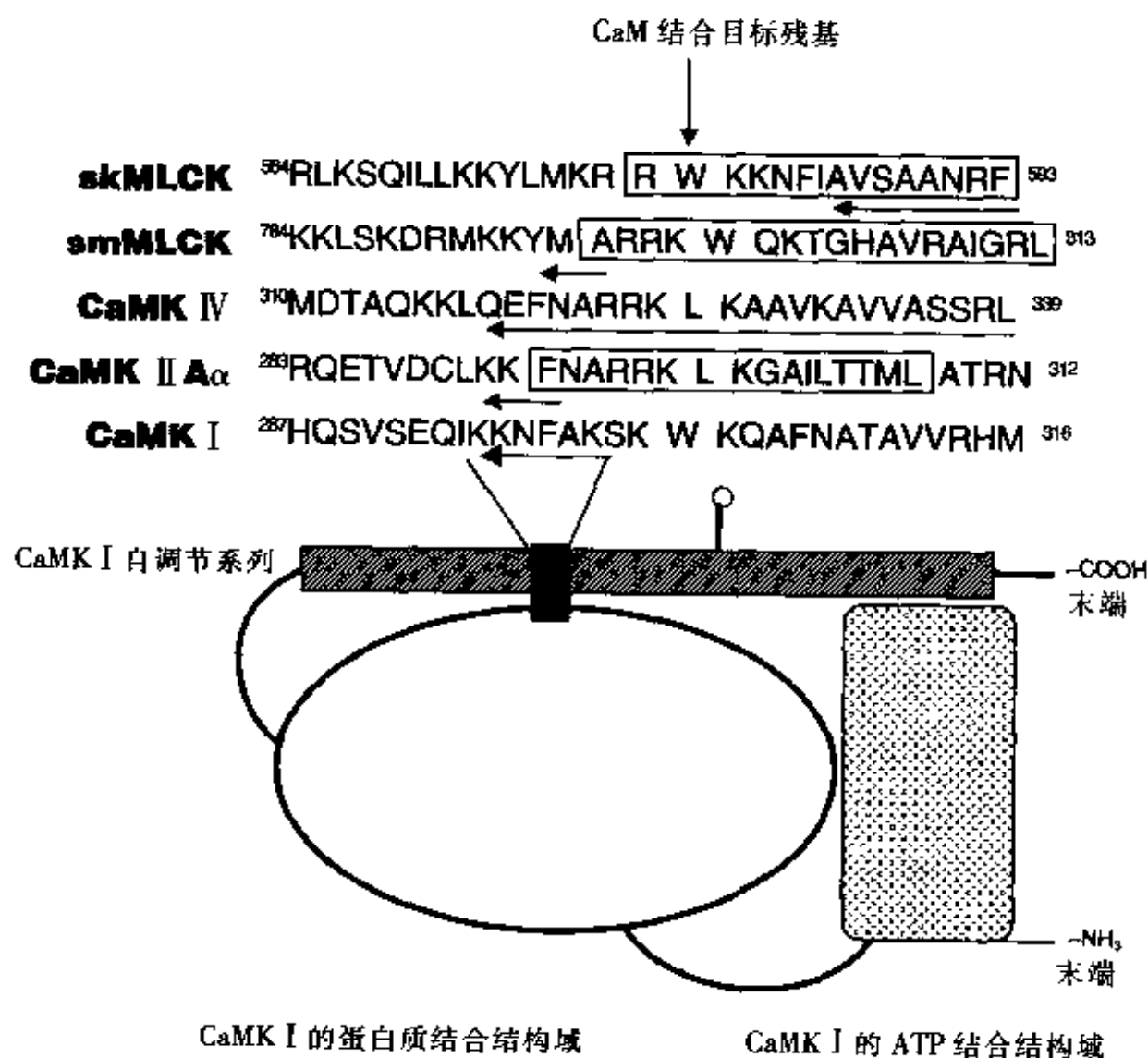


图 13-2 来自 CaM 调节蛋白激酶的自调节结构域的线性蛋白序列与模式图表示的 CaMK I 的结合。五个 CaM 依赖的蛋白激酶的单字母氨基酸密码子序列和序列的位置如图所示，CaM 结合结构域在酶的方框部位，酶的 CaM 结合结构域目标疏水的残基用纵向箭头指示，水平箭头表示限制性蛋白水解或 C-末端缺失突变的核心自抑制序列（箭头方向表示缺失方向）。下方的模式图显示自调节结构域（斜线阴影部分）和两个 CaMK I 激酶结构域的关系。CaMK I 的核心自抑制序列（黑色方块）与较大的蛋白底物结合结构域产生分子内相互作用，而 CaMK I 的疏水性目标残基（Trp303）则指向酶外（杆状圆圈结构表示）

的是,除了 skMLCK 以外,许多钙调蛋白激酶的自动抑制序列都定位于各自自动抑制子的 CaM 结合序列的末端(图 13-2)。

有研究者利用人工合成肽的抑制作用去抑制 MLCK 和 CaMK II 的具有催化特性的片段,结果显示自动抑制子 C 端和 N 端的氨基酸,通过结合激酶结构域的额外区域也可以抑制酶的催化活性。这些结果引出一假设:钙调蛋白激酶可能通过一种内立体化学(intrasteric)机制被自动抑制。钙调蛋白激酶的自动抑制子是一段两侧加有额外氨基酸的关键肽段,二者共同阻止底物向酶结构域接近。利用 C 端缺失突变和限制性蛋白水解去除自动抑制子和两端侧序列,暴露出底物结合位点和催化区域得到一种新酶,它同样可以被 CaM 活化。因此, CaM 可能通过一种与缺失突变和限制性蛋白水解相似的方法,从酶的活化位点将自动抑制区除去来激活钙调蛋白激酶。

二、钙调蛋白激酶的三维结构

CaMK I 的晶体结构首次揭示了 CaM 激酶的催化与自调节片断间的空间排列,并提供了支持占位抑制模型的直接证据。CaMK I (10~275 残基)由两个叶状结构组成:一个较小的 N 末端 ATP 结合结构域和一个 C 末端结构域。这两段叶状结构由催化裂口分开,这个催化裂口即假说中的由 ATP 至蛋白质底物的磷酸转移位点。两段结构域的构象都与其他蛋白激酶类似, CaMK I 结构的特别之处在于其 C 末端自主调节序列(276~316 残基)的出现,该结构与酶的 ATP 及蛋白质底物结合结构域相互作用并起空间阻断作用。CaMK I 基因 C 末端的缺失诱变(deletion mutagenesis)实验证实:位于 294~298 残基之间的部分构成了维持酶处于抑制状态的核心自抑制区(core autoinhibitor), CaMK I 的晶体结构显示这些残基与酶的 C 末端结构域发生作用。核心自主抑制区的一段特定残基苯丙氨酸 298 与疏水口袋作用形成 CaMK I 蛋白底物结合位点的部分结构, C 末端该残基的丢失导致 80% 的酶表现为有活性的 CaM 依赖性酶。事实上,在 CaMK II 结构模型中, CaMK II 核心自抑制区中同源苯丙氨酸 293 与其激酶亦发生类似作用。

CaMK I 的晶体结构还显示了 N 末端苯丙氨酸侧的一些疏水残基如 Ile286, Val290 及 Ile294 亦与其 C 末端结构域作用。另外, C 末端核心自主抑制区侧的 305~316 残基与 N 末端结构域结合并改变酶的 ATP 结合环。这些结果显示 CaMK I 的核心自抑制区序列与激酶两叶结构域都广泛接触。人工合成的与 CaMK I 294~321 碱基一致的包含大部分核心自抑制区的肽链,在其抑制酶的基本活性能力上与肽链底物竞争性抑制,而不与 ATP 竞争。简而言之,对 CaMK I 的生化及结构研究都显示:294~298 碱基的核心自主抑制序列和 N, C 末端的 286~294 碱基及 305~316 碱基,分别参与了阻断磷酸受体蛋白进入 C 末端结构域和磷酸供体 ATP 进入 N 末端的过程。

对 CaMK I 自抑制区的研究结果与其他 CaM 激酶研究结果一致,并支持这一族酶占位性抑制的共同机制。MLCK 和 CaMK II 分子模型缺乏晶体学证据,故该模型只用来解释这些酶的肽段抑制和基因突变。这些模型的三维结构主要依据 CaMK I 晶体结构建立,并在多方面与其复合体相似。这两个模型都包含两个球形结构域:由催化裂口分隔的 N 末端 ATP 结合区和较大的 C 末端叶状结构。这说明,与 CaMK I 类似, MLCK 和 CaMK II 自抑制序列的 N 末端与激酶较大的 C 末端广泛接触。证明自抑制区与酶底物结合区的空间内相互作用过程与肽段抑制和基因突变研究一致。

然而, CaM 激酶家族的自抑制序列间仍可能存在差异。在 CaMK II 的特例模型中,肽段抑制研究显示 CaMK II 中自抑制结构域的 N 端抑制 ATP 结合至该酶,这一结果也表明了其间的相互作用。SmMLCK 与 CaMK I 结构不都在于它的 C 端,半数的自抑制序列穿过催化裂口,而不是像 CaMK I 那样与外部富含甘氨酸的 ATP 结合区相互作用。由于在缺乏 CaM 时 smMLCK 和 skMLCK 能结合 ATP,这就有利于建立一个带有不同于 CaMK I 那样空间阻断 ATP 结合环的自抑制结构域的 MLCK 模型。还有, smMLCK 磷酸化自然发生,畸变点位于自抑制序列的 C 端,与自抑制区的 C 端序列一致或直接与活性位点作用。TWITCHIN 激酶是一种与 smMLCK 高度同源的酶,它的三维结构显示了自抑制结构域与特定酶的催化裂口直接相互作用。尽管细节上可能存在差异, SmMLCK 与 CaMK I 的分子模型仍提示在激酶结构域和自

抑制序列间存在广泛接触,与CaMK I类似,该接触面阻断了这两个酶的激酶结构域。

三、CaM 结合于钙调蛋白激酶

CaM 激酶的CaM结合结构域已被定位于特定肽段序列,smMLCK和skMLCK的蛋白水解实验首次成功鉴定了这两个酶的CaM结合肽段序列,后来应用肽链合成技术在磷酸激酶和CaMK II的催化结构域内鉴定CaM结合序列。而基因缺失技术成功地在CaMK I和CaMK IV中鉴定CaM结合序列,同时发现CaM依赖的蛋白激酶CaM结合结构域与酶自主抑制序列天然一致并重叠,这一事实有力支持了CaM结合至CaM激酶与酶活性密切相关的观点。

C端基因缺失技术表明位于CaMK I的309~314位碱基具有双功能,而且对CaM有高亲和力,CaMK I的部分自抑制序列与ATP结合环反应。这些试验还表明位于CaMK I的300~305位碱基还参与与CaM的反应。CaMK I三维结构中300~305位残基的空间结构为研究CaM识别CaMK I提供有力依据。而大多CaMK I的自抑制序列是螺旋结构而且直接与酶的催化核心反应,CaMK I的300~305位残基形成环状并背向酶,即出现反常的303位色氨酸突向溶剂的现象,故303位的色氨酸可能是 Ca^{2+} /CaM作用的起始位点,能否影响该侧链与其他CaM依赖性激酶有关,因为该家族的其他酶疏水区的同源位点高度保守。在溶剂中,CaM结合序列位于N端一侧的疏水残基可作为 Ca^{2+} /CaM识别CaM激酶及其他钙调蛋白的信号,这一观点由替代实验支持,即由较少较小的疏水残基替代smMLCK800位色氨酸, Ca^{2+} /CaM削弱了酶的活性。

对CaM激酶CaM结合序列的进一步研究发现几乎所有的序列长为20~30个氨基酸,结构简单,呈兼性分子。对CaM结合肽段的研究发现CaM激酶与 Ca^{2+} /CaM的作用过程。对MLCK的CaM结合激酶肽段的荧光及交联试验显示,当与 Ca^{2+} /CaM及与 Ca^{2+} /CaM的N端和C端反平行接触时CaM结合激酶肽段呈螺旋结构。溶液中小角度X线散射研究显示,与MLCK反应时 Ca^{2+} /CaM在复合物中剧烈收缩。

三维液态或晶体结构的 Ca^{2+} /CaM与skMLCK、skMLCK或CaMK II的CaM结合肽段的接触实验证实了肽段结合方式,这三种独立复合体作用方式相似。在每一例中,CaM结合肽段卷曲成兼性螺旋并同时与 Ca^{2+} /CaM的两结构域反应,肽段的N端与 Ca^{2+} /CaM的C段结构反应,而肽段的C端以反平行方式与 Ca^{2+} /CaM的N端结构域反应。 Ca^{2+} /CaM围绕螺旋肽链收缩,在肽链基本残基与 Ca^{2+} /CaM的酸性侧链间发生静电反应。但是,发生在 Ca^{2+} /CaM每个结构域的疏水口袋与肽段上疏水侧链的最充分的相互作用是非极性的范德华力。在这三个肽段中,与保守序列同源的,受溶剂影响的及303位疏水色氨酸与 Ca^{2+} /CaM的C段疏水口袋相互作用或发生“锚合”。相反, Ca^{2+} /CaM的N端结构域与这三个肽段的结合则因CaM结构域相应处理的不同而异,这种处理是结合点内适当调整的结果,该结合点现在被称为两结构域间的“扩展结合点”。

简而言之,对CaM依赖性蛋白激酶的自主调节结构域的研究结果为揭示 Ca^{2+} /CaM激活这些酶的机制提供可靠依据。CaM激酶的催化结构域在结构上与该家族的其他蛋白激酶相似,但仍因广泛的自抑制序列使活性位点发生占位抑制而维持失活状态。 Ca^{2+} /CaM依赖性激酶活化是一个包括由 Ca^{2+} /CaM识别失活酶上CaM结构域的保守疏水残基过程的多步反应。CaM结合序列非常接近而且大多与自抑制序列的C端重叠,这提示存在一个潜在机制,通过这一机制 Ca^{2+} /CaM的结合可使CaM依赖性蛋白激酶迅速转入活化状态。 Ca^{2+} /CaM与CaM结合结构域残基的结合将改变邻近自抑制肽段的空间结构,使自抑制区与催化结构域之间失去占位作用。 Ca^{2+} /CaM结合后,底物结合位点与蛋白激酶的催化裂口分别暴露,使依赖于CaM的酶活化。

四、CaM的C端结构域与蛋白激酶疏水端保守序列的相互作用

Ca^{2+} /CaM的识别,高亲和力及对多种蛋白激酶的活化作用的确切分子机制尚未弄清。对 Ca^{2+} /CaM-skMLCK相互作用的早期热力学分析认为:多因素参与了 Ca^{2+} /CaM依赖性酶的活化过程。第一步是 Ca^{2+}

/CaM 与 skMLCK 间的疏水作用促使非活性 Ca^{2+} /CaM 激酶复合物形成；第二步以 CaM 与激酶间短程范德华力、氢键及静电作用激活酶。这个热力学模型与 Ca^{2+} 依赖性酶暴露于 Ca^{2+} /CaM 两个结构域的疏水表面相一致，而且在结构上显示了 Ca^{2+} /CaM 以相同的疏水表面与 MLCK 的两个肽段直接接触。 Ca^{2+} /CaM-MLCK 肽连复合体的三维结构也证明肽段上的疏水残基与 Ca^{2+} /CaM 的酸性侧链发生静电作用，在 Ca^{2+} /CaM-CaMK II 复合体中反应过程与此相似。但各种 Ca^{2+} /CaM-肽链与 CaM 激酶- Ca^{2+} /CaM 反应的相关程度尚不明。为了解 Ca^{2+} /CaM 依赖性 CaM 激酶的活化机制，近年来的研究集中于 CaM 两结构域的结构功能关系上，特别集中于每一肽链的疏水口袋。常用点突变方法鉴定 Ca^{2+} /CaM 上与各种 CaM 激酶结合的区域和多发区。利用谷氨酰胺检测了广泛存在于脊椎动物 CaM 中的 9 种蛋氨酸，在 Ca^{2+} /CaM 的 C 端结构域的亲水表面鉴定出 109 位蛋氨酸和 124 位蛋氨酸，其作用是与 smMLCK 形成高亲和力复合体。124 位蛋氨酸是所有已知 CaM 中共有的氨基酸，它们与 smMLCK (800 位色氨酸) 和 skMLCK (580 位色氨酸) 的 CaM 结合肽链的保守疏水性残基发生疏水接触。以亮氨酸代替 109 和 124 位蛋氨酸，它与蛋氨酸有相似的疏水基团，转换无需能量，转换后对 Ca^{2+} /CaM 与 smMLCK 的亲和力几乎没有影响，说明 smMLCK 与两个非极性残基的反应是天然的疏水性作用。

Ca^{2+} /CaM 的 124 位谷氨酰胺畸变会引起它与 CaMK I、CaMK II 和 CaMK IV 亲和力的下降，故 124 位蛋氨酸可能与其他蛋白激酶的保守疏水残基发生相似的疏水作用。事实上， Ca^{2+} /CaM-CaMK II 肽段复合物的三维结构证实 Ca^{2+} /CaM 的 124 位蛋氨酸直接与 CaMK II 的疏水残基和 303 位色氨酸结合，近来的分光镜试验证明 CaMK I 的同源 303 位色氨酸与 Ca^{2+} /CaM 的 C 端结构域相互作用。CaM 中的 124 位蛋氨酸的重要功能由如三氟拉嗪或 w-7 的药物与 CaM 之间的三维复合体所证实，它竞争性抑制大量 CaM 依赖性酶的活化。晶体学和磁共振显像证实药物中芳香环与 Ca^{2+} /CaM 的 124 位蛋氨酸的显著疏水作用。对 CaM 两个疏水口袋的基因突变研究中，在 Ca^{2+} /CaM 的 C 端结构域鉴定出一个互补的疏水口袋表面，它们与 smMLCK、CaMK II、CaMK IV、CaMK I 及可能包括 skMLCK 的保守疏水残基相互作用。这些疏水表面与 CaM 抑制区结合位点相符合，这为设计旨在干扰 CaM 信号途径的适当药物提供潜在目标。

五、CaM 的 124 位蛋氨酸调节钙调蛋白激酶的活性

除了与四种 CaM 激酶发生疏水性相互作用外， Ca^{2+} /CaM 的 124 位蛋氨酸还参与调节 Ca^{2+} /CaM 激酶的最大活性。以非极性亮氨酸或极性谷氨酰胺代替 124 位亮氨酸，将在相似的程度降低 smMLCK 的最大酶活性。 Ca^{2+} /CaM-smMLCK 肽链复合体的晶体结构进一步显示 124 位亮氨酸与 smMLCK 的 796 位丙氨酸接触。重要的是，该丙氨酸是 smMLCK 核心自抑制序列 (794~796 残基) 的组成部分，取消折断氨基酸将使酶进入活化状态。 Ca^{2+} /CaM 的 124 位蛋氨酸的亮氨酸和谷氨酰胺变异都会降低 smMLCK 的活性，它通过部分影响 124 位蛋氨酸与核心抑制残基 (如 796 位丙氨酸) 间的范德华力发挥作用。另外， Ca^{2+} /CaM 的 C 端结构域中除 124 位蛋氨酸以外的其他疏水性残基，如 112 位亮氨酸也与 smMLCK 的 CaM 结合结构域接触并调节酶的最大活性。因此，范德华力在 smMLCK 与 Ca^{2+} /CaM 的 124 位蛋氨酸和 112 位亮氨酸相互作用过程中发挥重要作用，这一结果与早期提出的依赖于 Ca^{2+} /CaM 的 skMLCK 及活化的两步热力学模型一致。

124 位谷氨酰胺变异也会导致依赖于 CaM 的 CaMK II 及 CaMK IV、CaMK I 的最大活性降低，说明在 smMLCK 中， Ca^{2+} /CaM 的 124 位蛋氨酸与其他三种蛋白激酶的核心自抑制区间存在范德华力。X 线晶体图像证实，124 位蛋氨酸与 Ca^{2+} /CaM-CaMK II 肽链复合体的 293 位苯丙氨酸以范德华力作用，该苯丙氨酸是由 Ca^{2+} /CaMK II 291~293 位残基组成的核心自抑制序列的重要部分。尽管尚未得到像 Ca^{2+} /CaM-CaM 结合肽链那样的 CaMK I 和 CaMK IV 的三维结构，但在 CaMK I 核心自抑制序列的相应残基可能是 298 位苯丙氨酸，在 CaMK IV 是 320 位苯丙氨酸。

总之，对 Ca^{2+} /CaM 的 C 端结构域中疏水口袋的基因突变研究显示，进化中形成的稳定的 124 位蛋氨酸在至少四种 CaM 依赖性蛋白激酶的活化中发挥重要的双功能。 Ca^{2+} /CaM 的 124 位蛋氨酸与 CaM 激

酶中 CaM 结合结构域的 N 端的保守疏水残基发生强烈疏水作用。此外, 124 位蛋氨酸与激酶核心自抑制区的残基间存在范德华力, 该作用对 CaM 发挥最大酶活力至关重要。

六、CaM 的 N 端结构域中疏水残基对不同 CaM 依赖性蛋白激酶的影响

点突变研究发现了 CaM 的 N 端结构域与不同 CaM 蛋白激酶反应时的不同作用。SmMLCK 肽链-CaM 复合体的三维结构显示, 在 Ca^{2+} /CaM 的 N 端的一些疏水残基与酶的 813 位亮氨酸间存在范德华力, 该作用被认为对 Ca^{2+} /CaM 锚合至 smMLCK 很重要。将 813 位亮氨酸替换为丙氨酸后, CaM 依赖的 smMLCK 催化结构域的酶活性大大降低, 尽管该酶仍能与 Ca^{2+} /CaM 结合。在补充实验中, 截断与 smMLCK CaM 结合肽链的 813 位亮氨酸残基发生范德华力的 CaM 侧链, 这样变异的 CaM 虽仍以较高亲和力与 smMLCK 结合, 但激发最大 Ca^{2+} /CaM 依赖性酶活力的能力逐渐下降。类似的作用在 CaM 71 和 72 位蛋氨酸的单一谷氨酰胺突变也可见到。这些结果说明 smMLCK 与 Ca^{2+} /CaM N 端残基间的范德华力主要功能不在于维持高亲和力复合体, 而对使特定酶逐步发挥最大活性起作用。

与 smMLCK 不同, Ca^{2+} /CaM 的 N 端结构域同一疏水残基突变并不影响 CaMK II 和 CaMK IV 的最大酶活性。CaMK II 肽链- Ca^{2+} /CaM 复合体的三维结构显示, Ca^{2+} /CaM 的 N 端结构域的三个残基 (19 位、68 位苯丙氨酸, 72 位蛋氨酸) 与 CaMK II 肽链的 308 位亮氨酸间有重要的锚合作用, 这一点引人注目。单独将 72 位蛋氨酸变异为谷氨酰胺使亲和力降低 4 倍, 而同时将 68 位苯丙氨酸变异为亮氨酸, 将 71 位蛋氨酸变异为丙氨酸使 CaMK II 亲和力降低 3 倍。这些结构说明 Ca^{2+} /CaM 的 N 端结构域的疏水残基对它与 CaMK II 亲和力至关重要, 但与 smMLCK 不同, 它对激发酶活性不那么重要。

令人吃惊的是, CaMK I 包括了 CaM 依赖性 smMLCK 和 CaMK II 的双重特性。 Ca^{2+} /CaM 的 N 端结构域中 32 位亮氨酸、51 位蛋氨酸、68 位苯丙氨酸及 71 位蛋氨酸对 CaMK I 亲和与活化起重要作用。这些变异的 CaM 通过特异的 CaMK I, 对升高 ATP 表面 K_m 产生的影响, 肯定了 CaMK I 三维结构中观察到的 CaMK I 自抑制区对 ATP 结合环施加的空间抑制, 而且为证实 Ca^{2+} /CaM N 端结构域在促进 ATP 进入酶的过程中发挥关键性作用提供依据。具有 CaM 依赖性激酶的 Ca^{2+} /CaM 的 N 端结构域的区别功能可能与 CaM 结合肽链的 C 端结构域和酶的残余物间的相互作用有关, 而在 CaMK I 则与自身 ATP 结合结构域相互作用。

七、CaM 依赖激酶与 CaM 之间的氢键和静电作用对 CaM 依赖激酶活化的调节

CaM 的许多氨基酸的改变对它与底物的亲和力影响并不大, 但是可以降低 skMLCK 和 smMLCK 的最大活性。例如, smMLCK 的第 82~84 和 118~120 位酸性氨基酸突变对其活性影响较大。这正是由于其中的某些氨基酸, 例如 84 位和 120 位的 Glu, 与 CaM-MLCK 肽复合体三维结构中的碱性氨基酸相互作用。然而, 另外一些对 skMLCK 的活化很重要的酸性氨基酸, 例如 CaM 6~8 位氨基酸, 并没有与 CaM-skMLCK 肽复合体 NMR 结构中的 skMLCK 肽发生联系。这说明 Ca^{2+} /CaM 与 CaM 结合结构域之间的氢键和范德华力并不足以使这些特殊的蛋白激酶激活, 二者之间的次级静电作用对于全酶的激活是必要的。

这种 CaM 结合结构域以外的附加的相互作用, 对于全酶活性的重要性再次在 smMLCK 中被证实。一系列 CaM-硫普罗宁嵌合体被用来研究 CaM 中几种极性目的氨基酸 (34 位 Thr、38 位 Ser、110 位 Thr、115 位 Lys) 在 smMLCK 激活中的作用。这些氨基酸并不与 smMLCK 中 CaM 结合肽相互作用, 更奇怪的是, 在 Ca^{2+} /CaM 复合体中, 它们各自之间的距离是 50 埃, 而在 Ca^{2+} /CaM-肽复合体中, 它们被拉近到只有 5 埃, 形成一种外表面, 后者完全区别于 CaM-肽复合体中的界面。这种新形成的外表面可能参与与其他蛋白激酶之间的氢键结合与静电作用, 从而提高全酶活性。因此, Ca^{2+} /CaM 复合物中的极性目的氨基酸的功能与 Ca^{2+} /CaM 中参与构成氢键的非极性氨基酸相似, 二者都不是高亲和力结合所必需的, 但是, 它们都有助于 smMLCK 发挥最大活性所必需的氢键、静电作用和范德华力的形成。

如上所述, Ca^{2+} /CaM 复合物激活蛋白激酶是一个复杂的、协同的现象。 Ca^{2+} /CaM 复合物 C 端结构域

中的非极性氨基酸包括一个固定不变的氨基酸,即124位的Met,它们之间的静电作用和目的酶自动调节结构域中的进化上较保守的构成氢键的氨基酸,对于高亲和力 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -酶复合物的形成起重要作用。另外, $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 的124位氨基酸Met与蛋白激酶自抑制序列之间的作用决定蛋白激酶的最大活性。 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 的C端和N端结构域与蛋白激酶的CaM结合结构域中的非极性氨基酸之间的范德华力是蛋白激酶激活所必需的。 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 的两个结构域中酸性氨基酸与激酶的CaM结合结构域中的基本氨基酸之间的静电作用对于全酶活性的产生是非常重要的。然而, $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 复合物N端结构域与不同激酶CaM结合结构域之间作用的不同使不同的蛋白激酶被激活的机制具有特异性。 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 复合物与CaM结合结构域结合后,使CaM结合结构域产生巨大的构象改变, $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 的几组极性目的氨基酸互相靠近,形成一个不同于CaM结合结构域而可与蛋白激酶作用的表面。而另外的氢键和静电作用需要某些受CaM调节的蛋白激酶的完全激活。

第二节 Ca^{2+} 在CaM依赖的蛋白激酶调节中的作用

一、CaM与CaM结合肽相互作用的 Ca^{2+} 依赖性

人们试图研究 Ca^{2+} 在CaM-酶复合物形成及活化中的作用。实验显示: Ca^{2+} 与CaM仅在各种skMLCK的CaM结合肽段存在时就可以结合,而不必要全酶。这证明了CaM的C端结构域与CaM结合肽段N端之间的相互作用是很重要的。skMLCK的CaM结合肽通过CaM与CaM II,使CaM的C端对 Ca^{2+} 的亲合活性增加了10倍,Kd值从 $1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 降低到 $0.1\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。这表明:在细胞内 Ca^{2+} 处于静息水平时,CaM的C端被 Ca^{2+} 部分占据,使它与CaM结合肽段N端保守的疏水氨基酸发生较为稳定的作用,而且可能与全酶的反应也是如此。人们进行了荧光实验及循环二色性实验来研究不同的CaM和skMLCK的CaM结合肽的不同片段之间相互作用时对 Ca^{2+} 的依赖性。实验得到了相同的结论:当细胞内游离 Ca^{2+} 达到静息水平时,CaM的C端结合2个 Ca^{2+} 便足以使其C端与CaM结合肽段N端稳定的结合起来。这些相似的实验结果还表明:CaM的C端结构域上的 Ca^{2+} 结合位点亲和性低,但结合迅速,当细胞外刺激产生时, Ca^{2+} 结合位点便可以通过与CaM结合肽段的剩余部分结合对细胞内 Ca^{2+} 的短暂升高作出反应。在完整的蛋白激酶的组成中,可能会有第二种 Ca^{2+} 结合途径导致酶的激活。最近有人提出了一种交替机制来解释CaM的 Ca^{2+} 依赖激活途径,交替机制中CaM与skMLCK全酶结合,而不是与skMLCK的CaM结合肽段N端结合。这一种机制认为:细胞内的 Ca^{2+} 浓度不足以促使CaM-skMLCK复合物的预先形成,而需要细胞内的 Ca^{2+} 浓度有一个短暂的升高来使CaM的结合和激活成为可能。实际上这两种模式可能都适合CaM,只是研究者选用的目的酶和细胞系不同而已,因此,它们本质上都与 Ca^{2+} 调节CaM的机制相一致。

二、酶结合的 Ca^{2+} 依赖和CaM的激活

许多实验利用CaM的 Ca^{2+} 浓缩功能来研究肽的结合,但他们既没有进一步测量CaM与完整蛋白激酶复合物的形成,也没有将CaM-酶复合物形成与酶活化这两个重要步骤区分开来。其中一个实验研究了以下现象:磷酸化酶激酶本身含有一个内源性CaM,但它还可以与一个外源性的至少已经结合了3个 Ca^{2+} 的CaM形成一个可被激活的复合体。平衡凝胶过滤可以证明在游离 Ca^{2+} 浓度非常低时仍旧可以形成低亲和力的CaM-smMLCK复合体。skMLCK的存在可以使CaM对 Ca^{2+} 的亲合力提高10倍。skMLCK的这种连接作用比smMLCK更强。SmMLCK与CaM结合后仍需要与至少结合3个 Ca^{2+} 的CaM结合后才能被激活。在荧光差异研究的基础之上,人们提出了一种类似的模型,这种模型阐述了一种非活性的 $2\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -钙调磷酸酶复合物,同时还证明了磷酸酯酶的活化需要至少结合3~4个 Ca^{2+} 的CaM-钙调磷酸酶复合物。

综上所述,CaM与CaM结合肽或钙调蛋白激酶结合的 Ca^{2+} 依赖性说明CaM可以与某些钙调蛋白依赖

酶在一定条件下形成非活性的复合物。例如，在细胞内 Ca^{2+} 水平低于 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 时， Ca^{2+} 结合位点仅被部分占据。更有意义的是，关于 CaM 结合肽段的实验提示，最初的分子内的相互作用发生在 CaM 的 C 端结构域和 N 端的半条肽段之间。这一结果与 CaM 突变实验结果相一致，后者结果显示： Ca^{2+} /CaM 复合体 C 端结构域的非极性氨基酸参与 Ca^{2+} /CaM 与 CaM 依赖蛋白激酶之间高亲和力氢键的构成（图 13-3, b 和 c）。 Ca^{2+} 结合实验的结果显示：细胞内 Ca^{2+} 的短暂升高导致至少 3 个 Ca^{2+} 对 CaM 与酶结合的正向协同作用， Ca^{2+} /CaM 复合物与酶之间的亲和力比单独的 CaM 与酶之间的亲和力高 10 倍。 Ca^{2+} 与低亲和力的位点的结合使 CaM 的构象发生改变，将 CaM 的 N 端结构域中的参与氢键构成的氨基酸暴露出来，这一改变同样也是某些 CaM 依赖蛋白激酶发挥最大活性所需要的。 Ca^{2+} 的短暂升高使 CaM 的两个结构域与 CaM 依赖蛋白激酶 CaM 结合位点形成范德华力、静电作用和氢键，导致酶的自动抑制结构域与催化结构域之间的固有的抑制作用被破坏（图 13-3d）。有研究者利用小角度 X 线散射和中子散射方法分析了溶液中 skMLCK- Ca^{2+} /CaM 复合物催化片段的构象，结果显示：酶与 Ca^{2+} /CaM 复合物结合后，其催化片段发生了较大的空间构象改变。由于 skMLCK 与其他受 CaM 调节的酶类的 CaM 结合位点以及自动抑制机制相同，上述模型的许多重要方面可能适用于其他蛋白激酶。实际上，外源性荧光实验已经证实：上述 CaM 引起的空间构象改变在其他的受 CaM 调节的酶类中也存在。

小结

1. 细胞内 Ca^{2+} 信号与钙调蛋白参与的过程之间的信号交换

已经发现了大量由细胞外刺激所产生的 Ca^{2+} 信号模型，它们小到局部的

Ca^{2+} 脉冲，大到整个细胞内的 Ca^{2+} 波。 Ca^{2+} 信号除了振幅会发生改变以外，频率也不尽相同。观察到的 Ca^{2+} 空间分布的暂时改变相当于一个代码，它可以被下游的效应分子解读并引起相应的细胞反应。钙调蛋白普遍存在于所有真核细胞中，受其调控的信号蛋白范围广，更重要的是它可以根据 Ca^{2+} 的变化来改变自己的形状，从而解码 Ca^{2+} 信号，因此，CaM 在细胞内 Ca^{2+} 信号转导中起重要作用。实际上，最近的研究证明：CaM-CaM II 复合物可以解码 Ca^{2+} 改变的频率，并将其转变为相应酶的激活。利用不同的分子间作用去激活不同的酶可能就是 CaM 解码过程的一部分，这些不同的分子间作用使 CaM 自己在 Ca^{2+} 信

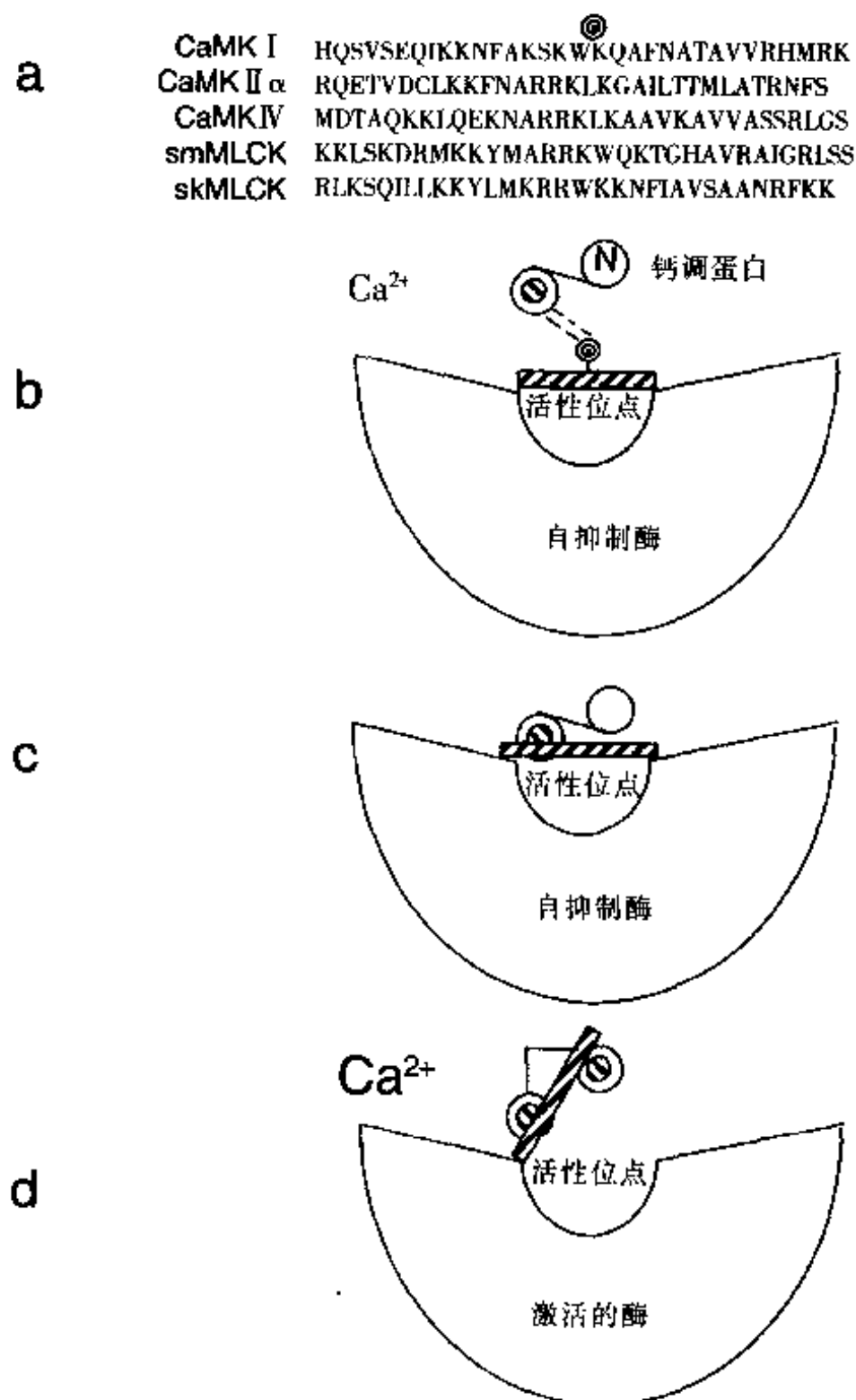


图 13-3 CaM 对钙信号反应激活蛋白激酶模型。a: 5 种 CaM 激酶的线性自调节结构域，保守的目标残基见圆圈指示处；b: 在静息 Ca^{2+} 浓度（小 Ca^{2+} 表示），CaM（哑铃形）的 C-末端结构域疏水口袋与无活性的蛋白激酶（半球形）的自调节结构域目标残基（斜纹方块）相互作用，CaM 的 N-末端结构域用 N 标明；c: CaM C-末端结构域的余下部分与来自灭活激酶的 CaM 结合结构域的 N-末端一半结合；d: 对瞬时升高的 Ca^{2+} 反应（大 Ca^{2+} 表示），整个 CaM 分子（包括 N-末端结构域）与酶的自抑制结构域更密切接触，暴露全部活性位点而使酶活化

号不同时产生差异，最终将这些信号转变为特定的酶的激活。

2. CaM 的这种能力除了依赖于在 CaM 结合蛋白分布区域的成比例分布以外，还依赖于与效应蛋白的共区域化 利用荧光标记的 CaM 来研究 CaM 在细胞内的分布，结果显示：在细胞类型和细胞内游离 Ca^{2+} 浓度不同时，CaM 的分布是有差异的。成纤维细胞内的荧光标记结果证实：在细胞处于静息状态下，不足 10% 的 CaM 是非结合的，单血清刺激细胞内 Ca^{2+} 水平短暂升高，50%~95% 的 CaM 是非流动性的。相比较之下，FRAP（荧光漂白后光恢复技术）证明静息的平滑肌细胞内的 CaM 并不是自由分布的，增加 Ca^{2+} 浓度可以产生多种效果，例如，释放一部分结合的 CaM，使另外一些 CaM 结合，并且使一部分 CaM 从细胞质转移到细胞核内。

上述研究表明，所观察到的 CaM 的静息分布和转移可能是 CaM 与特定的 CaM 结合蛋白作用的结果。因此，CaM 与有效 CaM 结合蛋白之间的相对亲和力不仅影响 CaM 的细胞内分布，还影响 CaM 的有效浓度。在体内对 CaM 依赖蛋白结合和活化的研究中发现 CaM 依赖蛋白与 Ca^{2+} /CaM 之间亲和力的范围比较广。CaMK II 在 Ca^{2+} /CaM 依赖的自动磷酸化后，与 CaM 的亲和力可以提高 1 000 倍。由于上述差异的存在，在细胞内 Ca^{2+} 处于静息水平时，某些酶类与 CaM 之间的亲和力可以调节 CaM-酶复合物的稳定性。另外，瞬间的 Ca^{2+} 信号可以调节 CaM 活化酶的效率。

3. 存在的问题 很明显，CaM 对细胞内 Ca^{2+} 改变所做出的反应并不是非常精确的。实验证明，由于细胞质的缓冲作用，当细胞内 Ca^{2+} 浓度缓慢改变时，只有浓度改变大于 $1\ \mu\text{mol/L}$ 时，CaM 才能做出反应。最近关于星形胶质细胞的实验证实了局部 Ca^{2+} 信号和 CaMK II 活化在空间上的一致。但是，另外的实验却得出相反的结果，海胆卵在有丝分裂时， Ca^{2+} 信号的改变与 CaM 的活化并不一致。因此，细胞如何协调局部 Ca^{2+} 信号与下游的换能器以及 CaM 如何瞬时调节蛋白是许多留待将来解决的问题之一。

第十四章 钙通道的分子生物学

许多非兴奋性细胞在磷脂酶-C (phospholipase C, PLC) 耦联受体激活时, 可导致 Ca^{2+} 从细胞内储池释放, 继而发生 Ca^{2+} 跨膜输入。 Ca^{2+} 输入是 Ca^{2+} 浓度持续升高的基础, 对基因表达、分泌、细胞增殖等各种细胞功能非常重要。非兴奋性细胞 Ca^{2+} 释放和 Ca^{2+} 输入之间的连接是由 Putney 首先提出的, 根据这个获能性 Ca^{2+} 输入 (capacitative Ca^{2+} entry, CCE) 模型, 激动剂诱导的 Ca^{2+} 输入是在细胞内储存 Ca^{2+} 消耗的基础上发生的, CCE 通道因而也被称为储存操纵通道 (store-operated channels, SOC)。本章概述有关哺乳动物 CCE 通道或 SOC 的分子结构及认识其基因的系统方法。

第一节 克隆储存操纵通道的策略

由于缺乏合适的药理学工具, 使纯化通道蛋白等识别 SOC 的工作受到相当的限制, 此外膜片钳分析或钙成像等功能性克隆方法也不适合筛选很多重组克隆, 特别是考虑到有内源性 CCE 通道或 SOC 存在时, 因为后者可造成难以与重组通道活动相区别的背景通道活动。一种有希望识别 SOC 相关或相同阳离子通道结构的方法缘于果蝇遗传学, 一般认为果蝇图像转导过程是由 PLC 激活介导光敏感阳离子通道开放, 进而导致持续的膜去极化, 这种持续去极化下的通道对 Ca^{2+} 有高度通透性, 但在突变型 TRP (transient receptor potential, 瞬时受体电位) 这种 Ca^{2+} 通透性显著降低。TRP 基因产物由 1 275 个氨基酸组成, 预计至少有 6 个预计跨膜结构域, TRPL (TRP-like) 是与 TRP 紧密相关的基因产物, 有 39% 的氨基酸序列与 TRP 相同。有趣的是至少有 4 个 TRP 和 TRPL 的推定跨膜区段与电压门控 Na^+ 和 Ca^{2+} 通道的跨膜区段有几分相似性, 在电压门控通道中 S4 区段构成电压传感器, 当膜电位变化时可促进 Na^+ 和 Ca^{2+} 通道开放, 但是, TRP 和 TRPL 没有这种电压传感器的典型氨基酸序列。因此猜想 TRP 和 TRPL 组成非电压依赖通道, 其相当于电压门控离子通道的单一结构域, 由光依赖 PLC 激活后的继发事件调控。这些事件怎样导致果蝇图像感受器细胞的光敏感通道开放还不清楚, 储存操纵机制曾被认为是发生机制之一, 但也可能包含多不饱和脂肪酸如花生四烯酸和亚油酸等的直接作用。

在昆虫细胞 Sf9、爪蟾卵母细胞、HEK 293 细胞中异种表达的 TRP, 可在肌醇 1,4,5-三磷酸盐 (InsP_3) 或 thapsigargin 消耗储存 Ca^{2+} 后激活, 导致 Ca^{2+} 电导率提高。TRPL 异种表达时构成活性非选择性阳离子通道, 可通过兴奋 G 蛋白结合受体或升高细胞质 $[\text{Ca}^{2+}]$ 进一步进行调控, $G_{11}\alpha$ 蛋白、 InsP_3 、 Ca^{2+} 、thapsigargin 或多不饱和脂肪酸等被认为是重组 TRPL 通道的初级激活剂或调节剂。果蝇图像转导级联和哺乳动物 PLC-级联的相似性提示, 哺乳动物中可能存在果蝇 TRP 和 TRPL 的同族体, 它们可能构成哺乳动物细胞的激动剂诱导 Ca^{2+} 输入通道, 寻找哺乳动物 TRP 同族体的几个策略因此成功确立, 将在以后小节分别叙述。

Fanger 和其同事选择了另一种有趣的方法识别 SOC 通道的分子结构, 他们用表达自然的储存操纵通道的 Jurkat 入白血病 T 细胞进行研究, 在寻找丝裂素激活的 Ca^{2+} 流时发现了通过此通道的 Ca^{2+} 流, 后来被认定是钙释放激活的钙流 (ICRAC)。Fanger 等用 γ 射线诱变 Jurkat 细胞, 选择显示 Ca^{2+} 依赖基因表达减少的细胞, 发现突变缺陷是 ICRAC 抑制的结果。这些 CRAC 缺陷的 Jurkat 突变细胞提供了一个用互补方法克隆 CRAC 通道成分的无偏系统 (unbiased system), 而且保留了 CRAC 的表型。但用这种方法识别获能性 Ca^{2+} 输入相关的基因还有待进一步研究。

第二节 果蝇 TRP 和 TRPL 蛋白的同族体

识别哺乳动物 TRP 同族体应用了几种不同的策略：一种方法是用果蝇 TRPL 和 TRP 保守氨基酸序列演绎出的变性寡核苷酸引物反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 扩增 TRP/TRPL 同源 cDNA 片段；另一些研究则利用表达序列标签资料库 (dbEST) 中不断增长的 cDNA 序列信息；还有通过利用 RNA 剪接反应的外显子绑扎法，在培养的哺乳动物细胞中识别到属于新 TRP 同族体的外显子，并且连续克隆出人 TRPC7 cDNA；在试图识别乌贼视网膜中表达丰富的蛋白时，从一个 92 kDa 的蛋白中得到部分蛋白序列，并在此肽序列基础上分离出新 TRP 同族体的 cDNA。

到目前为止，已克隆出 7 个哺乳动物 TRP 同族体的全长 cDNA，TRP1、TRP2、TRP3、TRP4、TRP5 和 TRP6 的 cDNA 已被识别 (图 14-1)，其方法将在后面详细列出。类似于果蝇 TRP 和 TRPL 蛋白，哺乳动物 TRP1、TRP3、TRP4、TRP5 和 TRP6 蛋白代表离子通道，在激动剂诱导的 Ca^{2+} 流入通路中发挥功能。研究还显示哺乳动物离子通道的 TRP 家族远缘成员参与痛觉感受，因其可被辣椒素等香草素类物质激活，故又被称为香草素受体 (VR)。此外在秀丽杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的基因组中已识别到超过 11 个 TRP 同族体，这些基因的产物之一 OSM-9 是嗅觉和其他化学感受神经元通路中不可缺少的成分。

哺乳动物 TRP 通道的门控机制还有争论，异种表达的 TRP1、TRP4 或 TRP5 组成的通道显示可由已知能消耗 Ca^{2+} 储存的方法激活，代表 SOC；相反的，TRP3 和 TRP6 阳离子通道则直接由二酰基甘油激活，尽管间接依据提示 TRP3 通道的激活中有储存消耗机制和 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的升高；在真核细胞表达时 TRP1、TRP3 和 TRP6 编码 Ca^{2+} 可透过但无选择性的阳离子通道，而 TRP4 和 TRP5 则组成主要允许 Ca^{2+} 通透的离子通道。

部分哺乳动物 TRP 对储存消耗敏感，组成主要允许 Ca^{2+} 通透的离子通道，而另一些则似乎为非选择性阳离子通道，对储存消耗不敏感。这些发现表明，对消耗不敏感的 TRP 很可能是经由与储存敏感的亚基形成多聚体而构成消耗敏感的 SOC。事实上，重组 TRP1 和 TRP3 通道可在静息状态下表现出活性，可能就是由缺乏调节通道活性所必需的辅助亚基所引起的，所以在异种系统中只不过表达这种多聚复合体中的一个组分，不能恢复自然 TRP 通道的生理相关属性。

一、RT-PCR 识别哺乳动物 TRP 同族体

编码 TRP4 和 TRP5 以及 TRP6 的 TRP 同源 cDNA 片段是通过 RT-PCR 为基础的方法识别的。保守氨基酸对蛋白质具有功能或结构上的意义，在其他同族 TRP 序列中也可能保存。基于此假设，两个 TRP 和 TRPL 中的保守氨基酸区域被用来演绎出一对变性寡核苷酸引物，以扩增与果蝇 TRP 和 TRPL 同源的哺乳动物 cDNA 片段 (图 14-1)。大多数研究中采用脑组织中分离的 RNA 作为反转录的模板，因为脑组织包含异质性很强的兴奋性和非兴奋性细胞。PolyA⁺ RNA 常规用来充实靶 mRNA，以减少 cDNA 第一条链合成时的错引风险。

进行牛 TRP4 (CCE1) 和兔 TRP5 (CCE2) 的识别时，首先识别保守氨基酸区域，这些区域位置相近 (20~200 个氨基酸)，以提高扩增同预计 TRP 和 TRPL 大小相配的 cDNA 片段的成功机率；其次，提出的引物序列变性程度越小越好；再次，PCR 过程中至少保存 5 个相邻氨基酸描绘引物，退火温度 (T_m) 要高于 50℃，以提高引物对退火模板的特异度；最后，两个引物的 T_m 应在相同的范围。结果得到了 133bp 的 cDNA 片段并进展克隆和测序，两种 cDNA 都显示了与果蝇 TRP 和 TRPL 序列的高度同族性。从扩增的牛和兔 cDNA 演绎出的氨基酸序列是相同的，但在这个阶段无法判断识别兔和牛的同族体是不是原序列。当全长的 cDNA 序列分离出后，表明由牛 TRP4 (CCE1) 和兔 TRP5 (CCE2) 基因编码的同源 cDNA 得到识别。

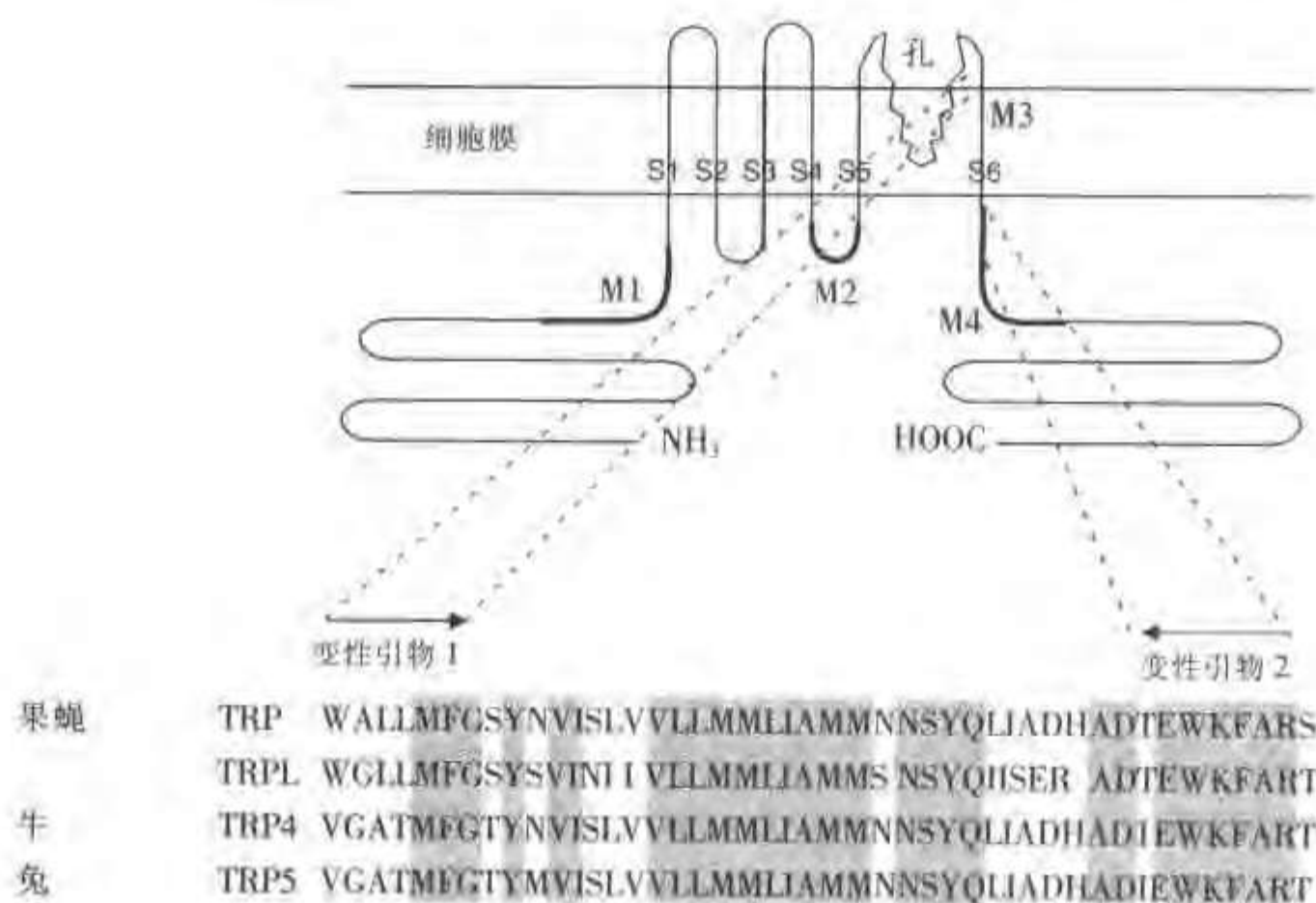


图 14-1 TRP 蛋白的透膜拓扑学和哺乳动物 TRP4 和 TRP5 cDNA 的克隆策略。上部: TRP 蛋白的预计跨膜结构。与双翅昆虫 TRP 和 TRPL 类似,哺乳动物 TRP4 和 TRP5 包含一个有 6 个推定跨膜螺旋 (S1、S2、S3、S4、S5、S6) 的疏水核。疏水核侧面是 N-和 C-末端的一个长的假定细胞浆结构域, TRP4 和 TRP5 包含一个与环形核苷酸门控离子通道孔形成区域相关的结构域,表示为孔 (pore),加粗部为 TRP 相关蛋白中保存的四个氨基酸序列基元 (motif) M1、M2、M3、M4 的位置。下部: 变性寡核苷酸引物 1 和 2 是从果蝇 (melanogaster) TRP 和 TRPL 预计跨膜片段 6 侧面氨基酸区域得到的,用这些引物以脑 mRNA 为模板的反转录 PCR 产生 cDNA 片段,并亚克隆和测序,得到的氨基酸序列与果蝇 TRP 和 TRPL 序列一致,相同的氨基酸加阴影,注意衍生出的牛 TRP4 和兔 TRP5 的氨基酸序列相同

二、通过数据库分析识别 TRP 相关基因

从 1991 年开始在随机选择的互补 DNA 克隆上进行自动化的部分 DNA 测序,以产生表达序列标签 (expressed sequence tag, EST),现在资料被并入 GenBank 的 EST 部分并继续实施,可通过因特网用 BLAST (Basical Local Alignment Search Tool) 演算法则通过文本搜寻或核苷酸搜寻的方式进行查询。

相对于 RT-PCR 方法,这种数据库搜寻可以更方便快捷地发现新的 TRP 相关蛋白。用 TRP 和 TRPL 序列查询,已识别到几个 EST 克隆,进而 TRP1、TRP2、TRP3 的完整 cDNAs 以及 TRP 通道推定入口亚基如 hINADL 得以描述。

这种方法对检测 TRP 近缘相关物特别有帮助,但也受到一定限制,原因如下:资料库的条目虽不断增长,但仍是有限的;EST 资料库序列可能包含测序错误,因为只有单链序列信息条目;在 EST 资料库中找到的 cDNA 序列往往较短,较难判断序列是否为所讨论的 cDNA 或蛋白的一部分;某个特别序列基元的存在并不一定预示有紧密的进化关系。

由于这些原因,识别新的 TRP 同族体的策略应包括基因组和蛋白资料库的分析。第一步,能有一个特别 TRP 蛋白序列或者其中部分用来筛选 WORMPEP 资料库,这个资料库包含根据现在已得到其全部序列的线虫 *Caenorhabditis elegans* 基因组预计的蛋白,已从这个基因组中识别到 11 个 TRP 同族体,用后面将描述的方法还可以发现新的 TRP 相关基因产物 (图 14-2)。第二步,分析所有可以得到的 TRP 蛋白的氨基酸序列是否有特殊的氨基酸序列基元存在并保存于排列好的序列中。在许多情况下,这种保守基元和推定跨膜片段存在和定位于 *C.Elegans* 基因产物中可以支持这些基因产物是 TRP 家族的成员;相关

的蛋白应包含至少 6 个类似推定跨膜片段的疏水区, 还应有另外一个区域相当于推定通道孔, 而且通过 TRP 相关蛋白排列识别的保守氨基酸序列或氨基酸基元应位于蛋白的可比位置。第三步, 从 *C.Elegans* 中得到的序列可以用来筛选 EST 和其他 cDNA 资料库, 识别更多的哺乳动物 TRP 远缘同族体。利用这个程序, 很容易检测到来源于鼠的 VR1 基因和源于 *C.Elegans* 的 OSM-9 基因等, 这些基因已被推定属于 TRP 基因家族, 但序列类似性却很低。

4 个哺乳动物以及双翅类昆虫 TRP 蛋白保守氨基酸序列基元的位置是 M1、M2、M3、M4。基元 M1 包含 25 个氨基酸, 位于推定跨膜片段 1 上游, 包含哺乳动物 TRP1 到 TRP6 氨基酸序列的共有序列 LXRLKLAIKYXXKXF-VAXPNCQQXL; 氨基酸序列基元 M2 位于跨膜片段 4 和 5 之间的胞浆内环 (共有序列 LGPLQISLGRM); 基元 M3 则是推定跨膜片段 6 的组成部分 (共有序列 VLLNMLIAM); 高度保守基元 M4 紧跟在跨膜片段 6 之后, 位于 TRP 蛋白 C-末端的胞浆内尾部 (共有序列 DXEWKFARXKLWXSXFXXGXTLPXPFNXXPSPK)。到目前为止, 基元 M1、M2、M3、M4 不类似于其他任何已知功能的氨基酸序列, 可能代表 TRP 蛋白的典型特征。

跨膜片段 4 和 5 之间部分胞浆内环氨基酸序列 (M2 基元) 分别来自前文所述识别的哺乳动物 TRP1~TRP6 的 TRP 蛋白、果蝇 TRP 和 TRPL、TRP 家族远缘成员如 TRP7、OSM-9、VR1 以及预计 *C.Elegans* 蛋白, 在所有这些蛋白中, M2 都精确定位于预计跨膜片段之间一致的位置。显然, 这些基元有分歧并且在 VR1 等蛋白中只有两个氨基酸得到保存。虽然如此, *C.Elegans* 的 14 个预计蛋白序列以及 *Saccharomyces cerevisiae* (酿酒酵母) 的 1 个预计蛋白序列含有 M2 和 M1、3、4 基元, 与果蝇 TRP 和 TRPL 或哺乳动物 TRP1~TRP7 等 TRP 家族成员相比有相当的序列相似性, 如与 TRP4 序列相比较, 相同氨基酸含量分别为 18% (S61648)、22% (K01A11.4) 和 39% (ZC21.2)。相同氨基酸序列小于或等于 18% 意味着两种蛋白质几乎没有结构上的相关性, 是比较两个无关膜蛋白序列时希望得到的结果。肌浆网 Ca^{2+} -ATPase (SERCA2) 与 TRP4 只有 16% 的氨基酸序列相同, 其序列不包含任何一种 TRP 家族特征性的氨基酸序列基元 M1、M2、M3、M4, 显然, SERCA2 与 TRP 蛋白无关; 相反的, OSM-9 蛋白也只包含 16% 的 TRP4 相同氨基酸序列, 但在期望位置有典型的氨基酸基元 M1、M2、M3、M4, 所以 OSM-9 属于 TRP 家族, 另外 15 种 *C.Elegans* 预计蛋白也是如此。

用这些 *C.Elegans* 蛋白在 EST 文库中查询, 可以识别到几百种 cDNA 克隆与 TRP 蛋白有同源性, 包括那些编码 TRP1、TRP2、TRP3 的 EST 克隆, 此外还发现了推定人 melastatin-1 蛋白, 它部分类似鼠 melastatin, 后者被描述为肿瘤抑制物, 但未探测到任何原核细胞 TRP 同族体。

LGPLQISLGRM	TRP4 AJ006203*
LGPLQISLGRM	TRP5 AF029983*
LGTLQISMGRM	TRP2 U40981*
LGPLQISMGM	TRP1 U95167*
FGPLQISLGRM	TRP3 Y13758*
FGPLQISLGRM	TRP6 U49069*
LGPKIIVKRM	TRPC7 (d1035682) *
LGPLQVSLGRM	TRP (果蝇)
LGPLQISLGRM	TRPL (果蝇)
LGPLQISLGRM	ZC21.2 (CETRP1)
LGPLKISLGRM	2746879*
LGPIYINIVAFM	C05C12.3
LGPIYQMAAKM	F54D1.5
LGPIYVTMAGKM	T01H5.5
LGPIYVMMIGKM	3243075* (人褪黑素)
LGFFIHLFKKM	W03B1.2
IGGSVISVGKC	K01A11.4 (GETRP2)
VGPFVLMVYKI	T10B10
FGPWAIIRDIL	Y71A12B.A
VGPFVLMVYTI	F28H7.10
VGPFVLMVYTI	T09A12.3
TGPFVQMIYSM	B0212.5 (OSM-9)
FGPMIVRVKLM	ZK512.3
FGSIVLMIKKM	F13B12.3
MGIYAVMIEKM	2570933* (大鼠 Vanilloid 受体 1, VR1)
FGIFVVMFVDI	C29E6.2
FGIYIFMMTRI	M0B5.6
IGIMLVILKHM	S61648* (酵母)

L L
GPLQIS GRM CONSENSUS OF TRP1~6
F M

图 14-2 TRP 通道和相关蛋白中 M2 基元的氨基酸序列。蛋白序列用 HUSAR 软件包 (德国癌症研究所, 汉堡) 的 Clustal W 运算法则排列。编号查阅 GeneBank 资料库 (* 号) 和 Wormpep 资料库 (<http://www.sanger.ac.uk/>)

三、TRP 蛋白的多样性

哺乳动物、线虫 (*C. Elegans*)、啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) TRP 相关蛋白的进化关系提示至少可以分为 3 个子类 (图 14-3)。其中一个子类包括 TRP1、2、3、4、5、6 和 3 个 *C.Elegans* 预计序列 (ZC21.2, 2746879, Y71A12B.A); 第二个子类包括 *C.Elegans* 的含 OSM-9 在内的 4 个蛋白和鼠 VR1; 第三子类有 8 个线虫蛋白、推定人 melastatin-1 蛋白和人 TRP7 蛋白。目前为止第三子类推定蛋白的功能还没有被描述过, 但此类成员含有惊人的序列同源性, 与哺乳动物和双翅昆虫 TRP 蛋白有相当的结构相似性, 因而有理由认为它们有类似功能, 如组成离子通道等。线虫 (*C.Elegans*) 的预计蛋白 K01A11.4 (CETRP2) 和啤酒酵母 (*S. cerevisiae*) 的 S61648 蛋白不属于这三个子类, 是这个蛋白家族的远古成员。

考虑到子类一中 3 种线虫蛋白对应于 6 种哺乳动物 TRP 蛋白的构成比例, 可以猜想人 TRP 蛋白是线虫 TRP 蛋白的 2 倍, 由于在线虫中可以检测到至少 16 种 TRP 相关蛋白 (见图 14-3 中的 2 和 3), 所以人可能有大约 30 种 TRP 相关蛋白存在。越来越多的证据表明 TRP 蛋白汇编组成至少包含 4 个 TRP 单体的异寡聚体离子通道, 考虑到有 30 种不同的 TRP 蛋白, 估计最少也有超过 105 种由不同的亚基组成的寡聚体通道复合体。

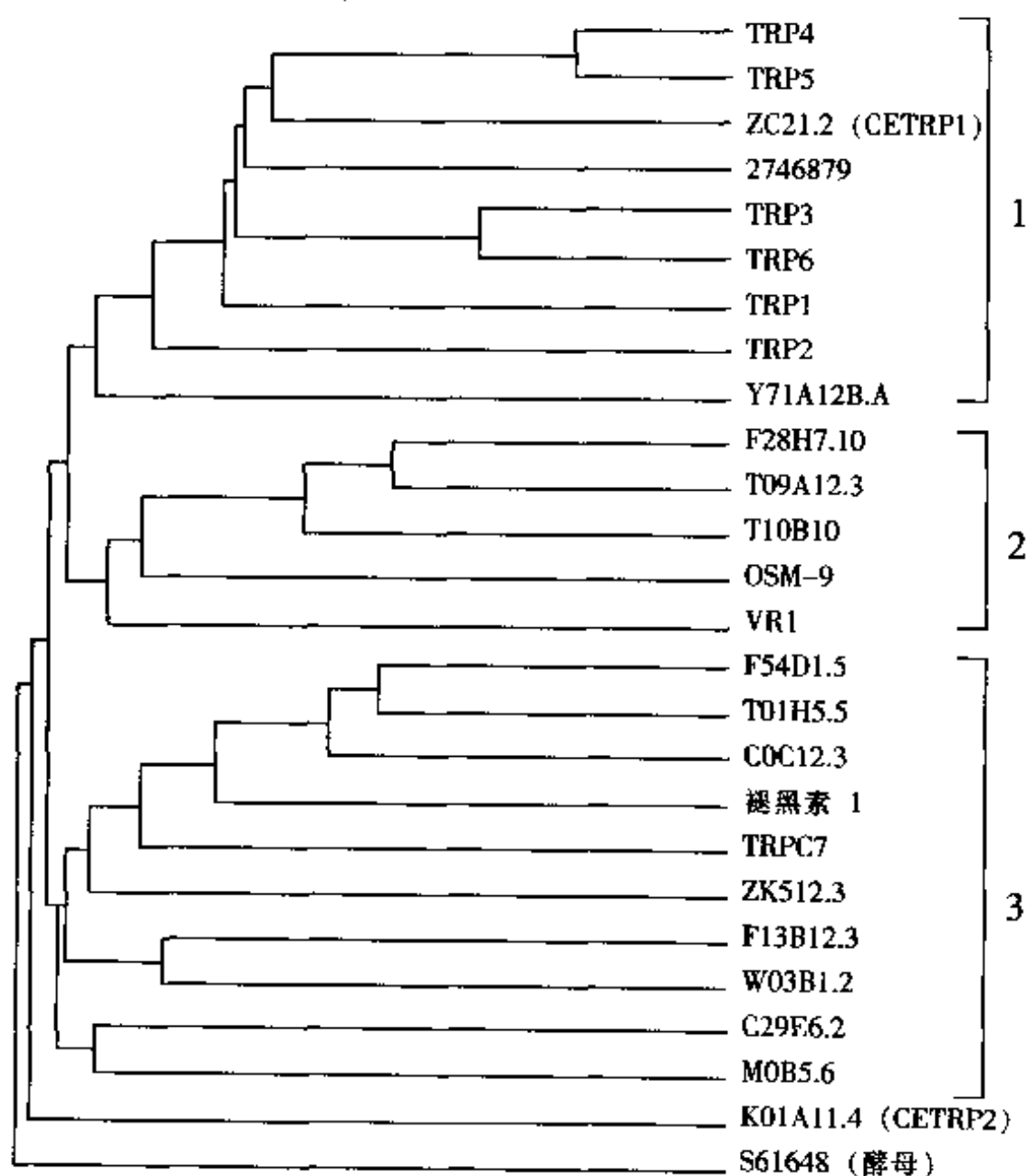


图 14-3 种系发生分析。用 Clustal/Clustree 程序分析包括氨基酸序列基元 M2、假定跨膜片段 5 和 6、氨基酸序列基元 M4 的蛋白序列进化关系。序列的来源见图 14-2 指示

四、哺乳动物 TRP 蛋白的初级结构和跨膜结构

大部分的 TRP 蛋白结构信息来源于对果蝇 TRP 和 TRPL 以及哺乳动物 TRP1、TRP2、TRP3、TRP4、TRP5、TRP6 的计算机序列分析, 总结如图 14-4。在寻找氨基酸序列基元时发现, 双翅昆虫和哺乳动物 TRP 蛋白的 N 末端存在 4 个锚蛋白样重复和一个线圈样结构。这些基元被认为参与了蛋白与蛋白的相互作用和寡聚过程, 但到目前为止, 这些基元的功能意义尚未被证实。前述的基元 M4 的氨基酸序列 (图 14-4) 中包含几个脯氨酸残基, 部分类似于同 Src 同源结构域 3 (SH3) 以及 Homer 蛋白相作用的结合基元。SH3 结构域选择性地结合到富含脯氨酸的序列, 最近的研究表明 Homer 蛋白将 I 群促代谢性 (metabotropic) 谷氨酸盐受体连接到 InsP_3 受体, TRP 蛋白的 M4 基元是否有与 Homer 或 SH3 结合基元相似的功能性质尚有待于研究。

分析 TRP 蛋白氨基酸序列的局部亲水性, 显示有 6~8 个典型的跨膜跨越片段以及信号肽序列的缺失, 所以, 似乎有理由假设氨基和羧基端位于细胞内, 而疏水片段穿过细胞膜。

有三种试验依据支持这种结构：①果蝇 TRP 和 TRPL 已知是钙调蛋白结合蛋白，钙调蛋白是位于细胞内的 Ca^{2+} 结合蛋白，钙调蛋白的结合位点映射 TRP 和 TRPL 的 C-末端部分，但是还不清楚哺乳动物 TRP 蛋白是否结合钙调蛋白；②果蝇 TRP 和人 TRP3 N 末端片段的表达可优势抑制 TRP 介导的膜电流，这种抑制与参与 TRP 通道激活的细胞内蛋白如 InsP_3 -受体或细胞骨架成分与 C-末端切短的 TRP 蛋白相互作用对寡聚体通道复合体产生的直接干扰有关；③在 COS 细胞表达 C-和 N-末端标记血凝素抗原 (HA) 的人 TRP3 后，Vannier 等检测 HA 抗原决定簇

和 HA 单克隆抗体的结合性。只有在增加细胞通透性后，才能发生与 HA 抗体的阳性免疫反应，表明 hTRP3 的 N-和 C-末端定位于细胞浆内。通过分析自然和插入的糖基化作用位点，Vannier 等能够建立一个包含有 6 个跨膜区域的 TRP3 的模型，只要没有新的实验依据，这个模型可能对其他 TRP 蛋白也是有效的。牛 TRP2 蛋白 (bTRP2) 似乎是个例外，bTRP2 演绎氨基酸序列只包含 4 个推定跨膜片段，对应于其他 TRP 蛋白的 3、4、5、6 跨膜片段，因而，认为 bTRP2 在 N-末端被切短了。

五、TRP 同族体的组织特异性表达

到目前为止，哺乳动物 TRP 基因产物的组织特异性表达还只限于转录水平，应用的技术有 Northern blot 分析、原位杂交、反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR)。以下分别讨论 TRP 基因的表达模式和研究方法上的一些缺陷。

(一) TRP 表达的 Northern Blot 分析

Northern Blot 分析可以给出所探讨 mRNA 的存在以及转录质量的信息。克隆的 cDNA 的大小可以与转录产物大小进行比较，从而可能得到替代剪接转录产物的信息，例如，Northern 分析 polyA⁺ RNA 以证实 TRP4 (CCE1) mRNA 的存在时，发现了长度分别为 1.9、2.1、3.8、4.8 和 7.0 千碱基对 (kb) 的转录产物，1.9 kb mRNA 在牛肾上腺特异性表达，是牛 TRP4 的截短的变体 (truncated version) bCCE1_{Δ514} 形成的替代剪接转录产物。

在解释 Northern blot 的结果前，要考虑到几个问题：杂交信号强度可能指示某一基因表达的相对丰度，但必须用看家基因如 β -actin 或甘油醛-3-磷酸脱氢酶的 cDNA 随后杂交同一印迹以控制 RNA 的质量和量。相对于更灵敏的方法如 RT-PCR，Northern blot 的 mRNA 检测限度较低，所以多数情况下，特异性 Northern 信号的存在提示组织中很可能发生翻译，有较大量的蛋白合成；另一方面，没有 Northern 信号也不能排除有转录产物和蛋白表达，这一点在解释 Northern 分析得出的 TRP 转录产物表达模式时必须考虑到 (表 14-1)，例如，用 Northern 分析在兔肾可检测到很低丰度的 TRP5 转录产物，但在鼠肾检测不到，用 RT-PCR 却可检测到。Northern 分析 TRP 表达的敏感性较低的一个解释是：这些试验使用总

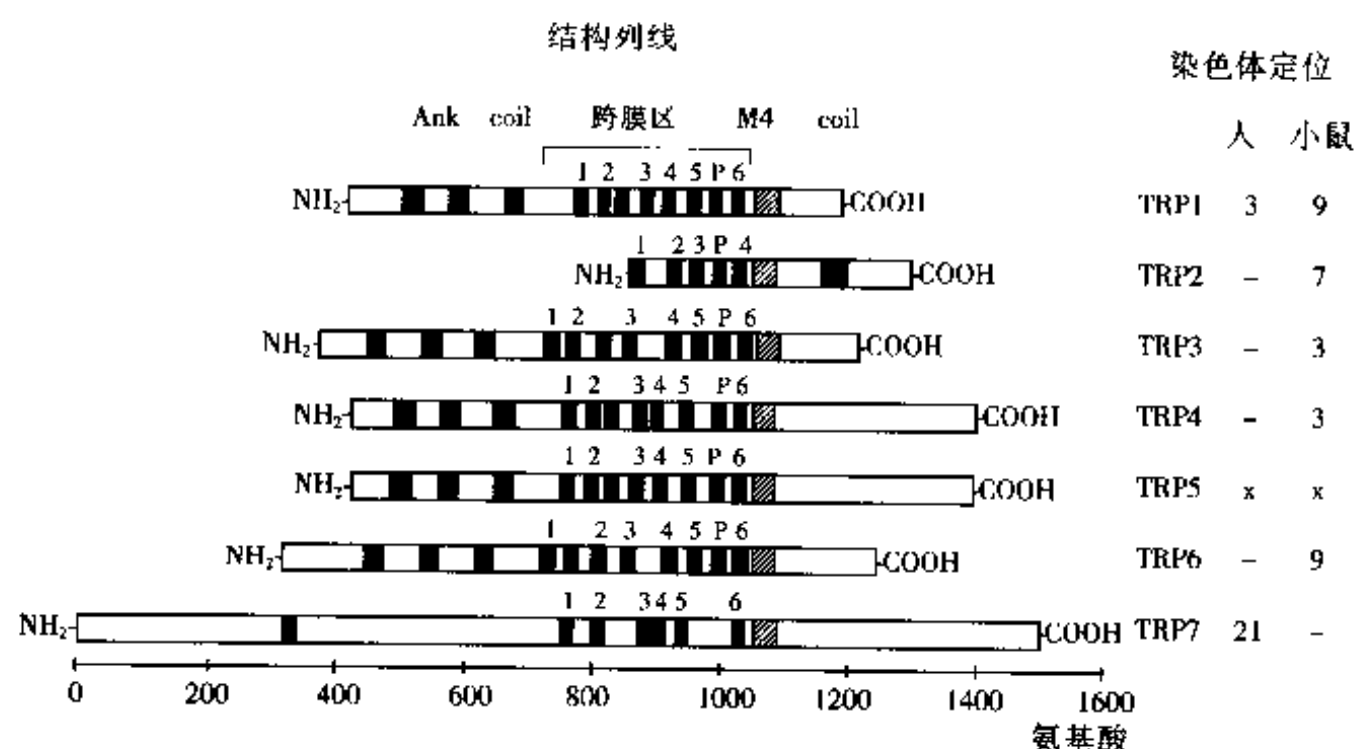


图 14-4 哺乳动物 TRP 蛋白 (TRP1~TRP6) 的推定结构域结构和染色体定位。左侧：按最初预计显示锚蛋白重复 (Ank)、卷曲螺旋结构 (coil)、跨膜片段 (1、2、3、4、5、6)、推定孔区 (P)，用简单分子建筑研究工具 (SMART) 进行计算机分析和联系，包括了高度保守的氨基酸序列基元 M4，在 TRP1、TRP3、TRP4、TRP5、TRP6 的核心有一个附加的疏水区，可能不代表跨膜片段。右侧：哺乳动物 TRP 基因的染色体定位显示，数据库分析显示人 TRP5 基因定位于 X-染色体

RNA 而不是用 polyA⁺ RNA, 但也有可能是因为基因表达的物种特异性所致, 例如, TRP4 mRNA 在牛肾上腺非常丰富, 因而可以从这种组织中克隆出来, 相反在鼠或兔肾上腺中用 Northern 分析未识别到 TRP4 转录产物 (图 14-5), 尽管鼠、兔、牛 TRP4 cDNA 有高度相同的序列。此外, TRP 基因在发育过程中的组织特异性表达也可产生杂交分析中 TRP 转录产物强度上的区别, 例如 Funayama 等用原位杂交方法检测鼠胚胎表明在 15 d 时无 TRP4 表达, 但在出生日的前后却可以很容易地检测到, 其后, 在脑的大部分区域 TRP4 的表达逐渐降低。类似地是在人胚胎肝脏组织可以轻易检测到 TRP1 的表达, 但在成人肝脏组织则难以检测到。是否 TRP 转录的不同水平依赖于激素的调节还有待更严格的验证。

(二) TRP 转录产物的原位检测

原位杂交提供了在细胞水平研究基因表达的更为适宜的方法, 可以在单个细胞中以很高的解析度检测到很低的表达。与 Northern 分析相似, 它也是在转录水平进行表达模式的分析, 因而只能对各蛋白的表达模式作有限的陈述。

TRP 基因在脑的表达研究已较为详细。鼠 TRP1 mRNA 在灰质区有广泛的表达, TRP6 的表达则仅限于齿状颗粒细胞层, 而小脑 Purkinje 细胞则是 TRP3 在鼠脑最突出的表达位置, TRP4 表达主要在海马回的齿状回, 海马角以及隔核、嗅球、大脑皮质, TRP4 在新生鼠脑中的表达研究得到类似的结果。根据这些结果, TRP3 和

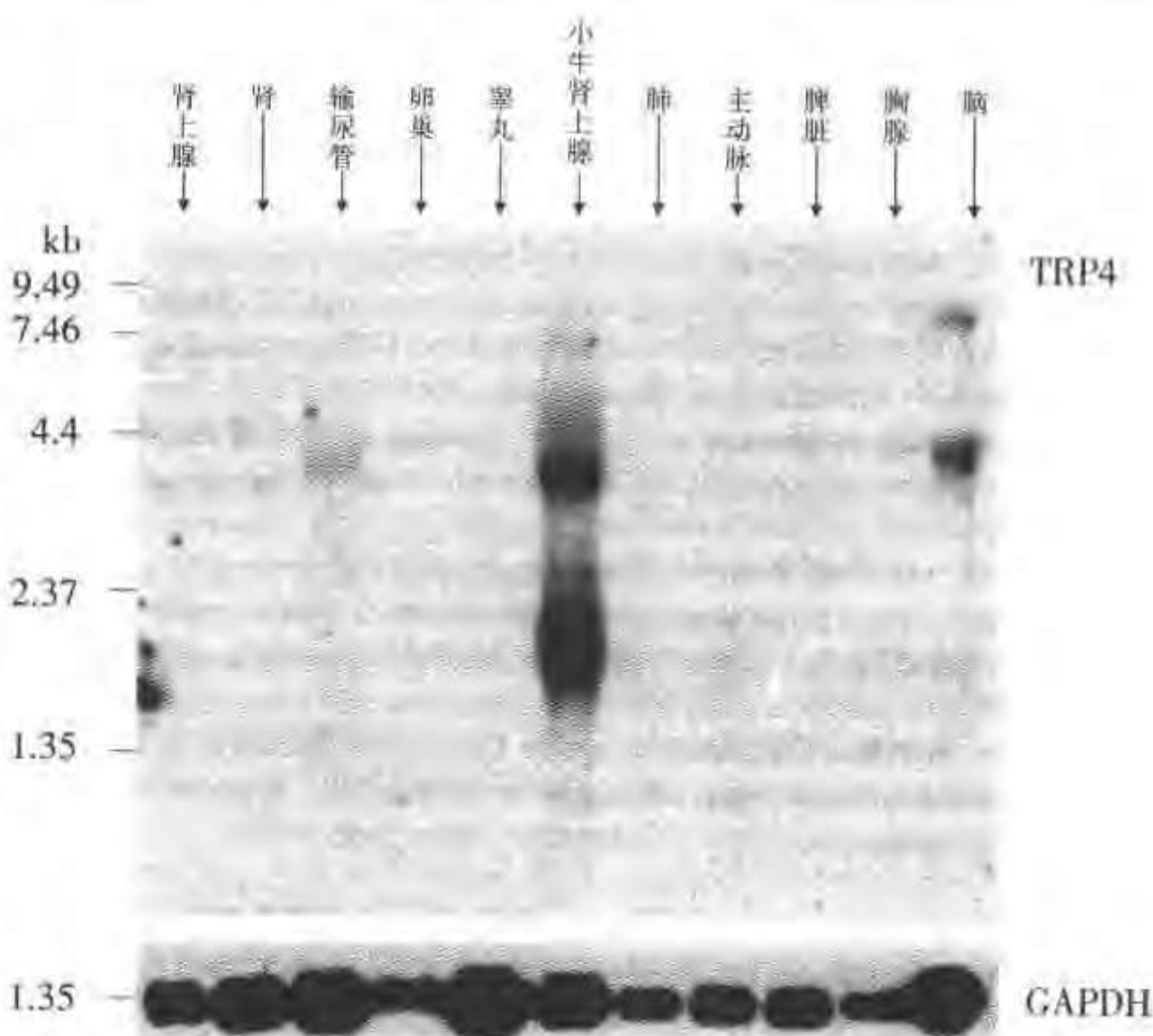


图 14-5 不同兔组织和牛肾上腺 poly A⁺ RNA 的 Northern Blot 分析。试验条件: 完整牛 TRP4 cDNA 用作探针, 应用 polyA⁺ RNA 的量和完整性通过在 GAPDH cDNA 探针存在的条件下杂交同一滤膜来控制 (下图), TRP4 转录产物在兔脑和输尿管及牛肾上腺分离的 polyA⁺ RNA 中被检测到, 但未从兔肾上腺的 polyA⁺ RNA 中检测到

表 14-1 通过 Northern 分析检测成年哺乳动物 TRP 转录物

	TRP1	TRP2	TRP3	TRP4	TRP5	TRP6	TRP7
脑	+	+	+	+	+	+	+
心	+		+	+			
骨骼肌	+						
肾	+		+		+		
肺	+					+	
尿道			+	+			
结肠	+		+				
小肠	+		+				
睾丸	+	+	+	+			
卵巢	+		+				
胎盘			+				
子宫				+			
肾上腺				+			
脾	+	+					
胸腺	+						
胰腺	+						
前列腺	+		+				
视网膜				+			

TRP4 在脑中缺乏明显的重叠表达,相反 TRP4 和 TRP5 在海马回的海马角锥体细胞中则有共同表达。TRP4 和 TRP5 的转录产物也存在于嗅球中,但 TRP4 是在这个脑区的内部颗粒层表达而 TRP5 则在帽状细胞层表达。总之,原位杂交实验表明几个 TRP 基因在神经元细胞有表达,TRP 基因产物很可能不仅促成非兴奋细胞的通道活性,也参与神经细胞的通道活动,有趣的是含储存操纵机制的自然 Ca^{2+} 流入通路在神经元中也被识别到,这些 Ca^{2+} 流入通路是否有 TRP 蛋白参与还有待进一步观察。

(三) TRP 细胞水平表达的 RT-PCR 分析

RT-PCR 可以从很少量的 RNA 中快速分析基因表达,并且可以平行地分析大量的样本,但是也要考虑到一些注意事项,以免因有漏洞的或异位的转录或虚假结果导致错误的解释:①扩增引物应是亚型特异性的并得自与模板相同的物种;②扩增的 cDNA 片段应经过限制性酶切图或亚克隆及连续序列分析识别;③只有在考虑到 RT 和 PCR 效率的个体差异性,一个细胞或组织中的 mRNA 转录产物量才可以进行比较。④应使用 Northern 杂交、编码所研究蛋白的独立全长 cDNA 克隆的分离等独立的方法验证 RT-PCR 的结果。但是一些实验结果在不符合上述任何一条标准的情况下就发表了。

以下概述以识别细胞中 TRP 转录产物为主要目的的一些研究,这些细胞已被证实有促动剂诱导的 Ca^{2+} 输入,例如,研究显示储存依赖的阳离子流参与胰腺 β 细胞分泌胰岛素,对 βTC3 细胞 TRP 表达模式的分析表明 TRP1、TRP2、TRP4、TRP6 可以用 TRP 亚型和物种特异性的引物检测到,而对 TRP3 和 TRP5 的检测却没有良好的重复性。为确定所得到的结果,用 Northern blot 分析 TRP 表达,发现虽然 RT-PCR 扩增到大部分的 TRP 基因,但只有 TRP4 mRNA 在胰腺细胞系中有丰富的表达,这个观察表明 RT-PCR 得到的结果应受到其他独立方法的验证和支持。另一个研究中对从鼠胰岛瘤 MIN6 和人胚胎肾细胞分离的 mRNA 作了 RT-PCR 分析,所用变性引物对应于鼠 TRP1、TRP2、TRP3、TRP4、TRP5、TRP6 六个基因,但在 MIN6 细胞中只检测到 TRP1 和 TRP6 扩增子,而用 TRP4 和 TRP5 的特异性引物对,只能扩增到源于 TRP4 的 PCR 产物,而无 TRP5 的产物,显然,用变性引物可能导致在比较 RT-PCR 研究中得到假阴性结果。同一作者用 Northern 分析验证他们的发现时,在 MIN6 细胞中检测到 TRP1 转录产物的强表达,而无 TRP3、TRP4、TRP6 表达。

有几个小组对 TRP 同族体在内皮细胞中的表达进行了研究,促动剂诱导的 Ca^{2+} 输入对这类细胞的一些特殊细胞功能是必需的。在研究 TRP 转录产物在人和鼠肺内皮细胞 (PAEC) 中的表达时应用了 RT-PCR, CCE 通道被认为参与了这些细胞的形状改变,TRP1 转录产物被检测到,而 TRP3 和 TRP6 未被检测到,提示 TRP1 参与到这些细胞的储存操纵通道中,而 TRP3 或 TRP6 则没有,但还没有对此结果的进一步评价。人脐静脉来源的内皮细胞 (HUVEC) 中 TRP 转录产物的存在的研究分析显示,TRP 亚型和种特异性引物 PCR 在 HUVEC 和 HEK293 细胞中都检测到了 TRP1、TRP3、TRP4 转录产物,表明所有检测 TRP 种类存在于此内皮细胞,但这些转录产物是在印迹扩增的 cDNA 片段并使用放射性核素标记的 TRP1、TRP3、TRP4 探针杂交时才检测到。

激素诱导 TRP 基因表达差异与促动剂诱导 Ca^{2+} 输入之间的关系已在牛主动脉内皮细胞 (BAEC) 中用半定量 PCR 进行了检测,用亚型和种特异性引物,选择提供每个扩增子近线性范围的扩增条件,用 PCR 产物印迹并随后杂交来加强测定敏感度,得到的结果用相应的 cyclophilin 表达水平进行标准化,后者的表达似乎不受不同的激素类刺激物的影响。TRP4 和 TRP5 在 BAEC 细胞中的表达在受 β -雌二醇、视黄酸、甲状腺素的作用后发生了变化,因而推断 TRP4 和 TRP5 在表达时受激素刺激物的调节,有趣的是促动剂诱导的 Ca^{2+} 内流在激素作用细胞后不发生改变。

在另外的两个研究中,用 RT-PCR 专门分析了 TRP 在不同组织和特殊细胞系中的表达。第一个研究结果发现在巨核细胞系 (MEG01、DAMI、HEL) 和血小板中 TRP1、TRP2、TRP3 通道参与了获能性 Ca^{2+} 输入,因为 RT-PCR 和随后的直接扩增子测序可以在细胞中识别到它们的转录产物;另一研究中源自鼠或人 TRP 亚型的寡核苷酸被用来作 RT-PCR 和随后的扩增子杂交,试验使用的是鼠的组织 and 细胞,用阳性信号带强度比较检测组织和细胞中的转录产物量,在各种组织中可以检测到不同哺乳动物 TRP 基因的

转录产物，部分与 Northern 分析结果一致（表 14-1），此外，还在 Jurkat、RBL、HEK293 等几个细胞系中发现有 TRP mRNA，这些细胞已知表达自然的储存操纵通道，有趣的是 BAEC 细胞等有丰富的 TRP5 转录产物表达，较以前的结果不同。

六、哺乳动物 TRP 通道功能性表达相关的方法

哺乳动物 TRP1、TRP3、TRP4、TRP5、TRP6 的 cDNA 在 HEK293、CHO、COS、爪蟾卵母细胞和 SF9 昆虫细胞中表达为功能性阳离子通道。重组通道的功能性质用膜片钳技术和（或）双重波长 Fura-2 荧光率测定方法进行了描述，这些表达研究的主要问题是表达所使用的细胞系统存在内源性通道，此种内源性通道具有与重组 TRP 通道相似的功能性质，由于缺少特异的药理学工具，内源性电流只能用振幅的大小或储存操纵 Ca^{2+} 输入在 TRP5 表达后 Ca^{2+} 敏感性的转变来区别。瞬时表达主要的问题是只有 30%~50% 的低转染效率阻碍了表达 TRP 细胞的检测。用包含报告蛋白如绿荧光蛋白（GFP）或 CD₈ 抗原 cDNA 的第二表达质粒共转染可以促进转染细胞的检测，现在可以得到同时包含 TRP 通道和报告蛋白 GFP cDNA 的串联表达载体。这些双顺反子结构在一个强病毒启动子下游包含 TRP cDNA、脑心肌炎病毒内部核糖体接入位点（IRES）和绿荧光蛋白的 cDNA，IRES 序列允许从一个转录产物同时翻译 TRP 和 GFP，从而所有的绿色细胞也应该表达 TRP 通道。用包含鼠延迟整流 K⁺ 通道和 GFP 的 cDNA 的双顺反子载体对此方法进行严格的评价，显示所有表达 GFP 的细胞也表达重组通道；与瞬时表达试验相反，重组 TRP 通道的稳定表达在一个克隆细胞系的所有细胞应有相似的表达水平，因而用 Northern 分析在稳定细胞系检测通道转录产物是合适的，而对于标记的稳定表达的 TRP 蛋白则可直接用抗体检测标记物，这种方法已被成功应用于血凝素标记的重组 TRP3、TRP6。直接针对 TRP 亚型的特异性抗体还没有被描述，但是如能得到它们将不仅对分析重组通道蛋白的表达水平有帮助，而且对自然通道的表达分析也有意义，进而可打开分析他们寡聚体结构的通路。

总而言之，TRP 同族体的克隆、对其表达模式的分析以及对它们功能的描述，为阐明促动剂诱导 Ca^{2+} 输入的分子结构、 Ca^{2+} 储存消耗与胞浆膜内储存操纵通道打开关系的细胞机制提供了重要的路径。在本节第三部分中列出的预期 TRP 同族体克隆数量提示其有高度的异质性，可能反映自然的促动剂诱导 Ca^{2+} 输入通路的多样性。

第十五章 海胆受精成像

细胞的特殊性给动物受精成像带来很大困难，卵是动物产生的最大细胞，精子是最小的细胞之一。观察受精的初始步骤是精卵结合并融合，在不同种属的动物中，这两类细胞的受精过程不同。受精的后续步骤包括第一次细胞周期过程中微管细胞骨架的显著活动，常因卵的大块胞浆遮盖而模糊不清，只有最显著的特性，如原核形成可用普通光学显微镜观察到。共聚焦技术是功能强大且很灵活的工具，已被大量研究者熟练掌握并得到发展，它不仅研究高分辨率下受精的结构特点，还可检测活配子的活动，包括配子融合后的信号活动成像。

表 15-1 受精相关样品共聚焦研究

样品种属	研究内容	样品种属	研究内容
人类	染色质 精子穿透 细胞骨架	非洲蟾蜍	细胞骨架 卵黄板 pH
恒河猴	细胞骨架	海胆	蛋白激酶 C 活性 皮质腺细胞排粒作用 钙动力学 内质网 细胞骨架
猪	皮质腺细胞排粒作用	星鱼	钙动力学 内质网
牛	中心体活性 免疫避孕	子囊	内质网
啮齿动物	内质网 钙动力学 pH 测量 细胞骨架动力学 皮质腺 受精表达	果蝇属	细胞骨架
		丝蛾	细胞骨架

共聚焦现已对大范围样品的受精及其后的发育活动进行了研究。每种样品的配子和胚胎都有各自的特殊性，但大多数类型的动物卵的共聚焦研究中都会出现三个不利因素：①细胞过大；②出现过多的卵黄或其他类型的胞浆内容物；③出现特殊的细胞外包被材料。这些不利因素不仅使胞浆细节模糊不清，还影响固定和免疫标记效果。大量动物样品的应用研究摘要见表 15-1，表中列出了应用共聚焦的各种类型的受精研究以及对特殊类型样品的特殊途径获得更多信息的要点。本章描述海胆卵和胚胎的准备，及用免疫化学共聚焦研究细胞骨架的形成。

一、材料

1. 仪器和附加材料

- (1) 12 个 50 ml 烧瓶，6 个 300 ml 和 600 ml 烧瓶。
- (2) 1 L 和 2 L 烧瓶。
- (3) 可处理的巴斯德吸管和小管。
- (4) 显微镜载玻片；22 mm×21.5 mm 盖玻片。
- (5) 塑料 6 孔培养板 (Falcon, 商品编号: 3046)。
- (6) 6 个 60~90 mm 直径的塑料带盖培养皿
- (7) 两个大浅盘。
- (8) 立式或倒置的共聚焦显微镜或荧光显微镜，配备有 10×或 20×物镜。
- (9) 80 μm 和 65 μm 筛网 Nitex 尼龙布。

2. 试剂和溶液

- (1) 速溶人造海水可依据制造商的指导进行生产。

(2) 无钙人造海水 16 mmol/L Tris-HCl、2.5 mmol/L EGTA、488 mmol/L NaCl、10 mmol/L KCl、29 mmol/L MgSO_4 、27 mmol/L MgCl_2 、0.8 g/4L NaHCO_3 ，用 NaOH 调 pH 为 8.1~8.3。

(3) 500 ml 0.5 mol/L。

(4) PBST (含 Tween-20 的磷酸缓冲液): 140 mmol/L NaCl、13 mmol/L KCl、2 mmol/L KH_2PO_4 、8 mmol/L Na_2HPO_4 、5 ml/L 的用蒸馏水配置的 20% 含 Tween-20 的母液。

(5) 1 mg/ml 多-L-赖氨酸 (分子量>300 000) 水溶液，等分成 1 ml 冰冻储存。

(6) 抗- β -微管蛋白单克隆抗体 E7，与酵母到人的大范围内的样品均可反应，对受精的海胆卵和精子的研究工作尤为出色。细胞和培养上清可购自 DSHB。一瓶细胞从生长到营养耗尽，离心培养基 (2 000 g, 10 min)，收集细胞，加叠氮钠到 0.05%，等分成所需体积，-80℃ 储存，荧光显微镜检测，培养上清液常用 PBST 以 1:10 稀释使用。

(7) 羊抗鼠多价抗体 (抗 IgG 和 IgM) 交联至异硫氢酸盐 FITC，抗体根据生产者的要求重新构建，等分成 25 μl 入 200 μl 离心管中，-80℃ 储存。

(8) Hoechst 33258，用水配成 5 mg/ml 的母液，避光 4℃ 储存。Hoechst33258 紧密结合 DNA，是可疑诱变剂，须戴手套操作。

(9) 培养基配制 在 15 ml 可处理离心管中，加 8 ml 甘油、2 ml 0.5 mol/L CAPS 缓冲液 (pH 9.0)、0.02 g DABCO 和 0.01 g P-次苯基胍 (可疑致癌物，操作时最好戴手套)。用铝箔保护好，室温下重叠放置 1~2 h 或至次苯基胍溶解。溶液呈轻微褐色，等分装入 1 ml 微量离心管，在空气中会变黑，-80℃ 储存。该培养基暴露在 -10℃ 以上会加速变色；-10℃ 储存可使用数周，-80℃ 储存可使用数月，直至用到变色。可用 PBS 或 PBST 代替 CAPS，但要确保 pH>7.4；FITC 荧光素在酸性环境中会淬灭。

3. 动物 实验用海胆从 Marinus Inc. 获得。使用两种类型：*Lytechinus pictus*，大约 4 月至 9 月受孕，*Strongylocentrotus purpuratus*，在 11 月到次年 3 月受孕。诱发产卵时受孕的雌性 *L. pictus* 常可产 1~10 ml 卵，成熟的雌性 *S. purpuratus* 能产 50 ml 卵。*L. pictus* 常容易产卵，但在高峰季节，*S. purpuratus* 在装运时会开始产卵，因此当 *S. purpuratus* 到达当天就应准备开始大量实验。

二、方法

1. 产卵

(1) 为准备产卵建好一个工作站，包括可处理玻璃巴氏吸管和球形烧瓶，多个 50 ml、300 ml 和 600 ml 玻璃烧瓶，小剪刀，一个钝镊子，一个装满碎冰的冰桶。0.5 mol/L KCl，两个较大的浅防水盘，加少量冰至理想温度，对 *S. purpuratus* 约 12℃，*L. pictus* 约 18℃。首先加少量冰将温度维持在理想范围内，放一块泡沫在盘水中，以减少水浴时产热。用 1~2 英寸碎冰盖住第二个盘的底，人造海水装满多个 50 ml 烧瓶至口缘，放入第一个水浴盘中，在第二个盘中放几个开口的 60~90 mm 直径的塑料有盖培养皿。

(2) 将装满人造海水的小容器 (与水族馆温度一致) 中的胚胎移至工作台上。小剪刀沿海胆口周膜剪开体腔去掉口部。检查性腺以判断性别和生育能力，*L. pictus* 成熟卵巢呈褐黄色到橙色，*S. purpuratus* 呈橙色。二者的睾丸均为深褐色，开口时有白色精子流出。成熟性腺占体腔的大部分，发育差的性腺象棕褐色碎屑样贴于体腔侧壁。

(3) 缓慢倒 0.5 mol/L KCl 入体腔 (烧瓶较方便)，立即将雌性海胆开口的体腔朝上放，将雄性海胆朝上放在培养皿内冰上。让雌海胆产卵持续约 10 min 直到卵流变慢，而后将雌海胆从人造海水的烧瓶中移出。如果色素已经释放入人造海水中 (*S. purpuratus* 常出现的问题)，立即在卵的上方将其吸出，并添加新鲜人造海水。检查雄海胆下面厚的胶性精子，收集并将精子用巴氏吸管移至 1 ml 离心管中，放于冰上。

2. 受精

(1) 让卵通过筛网以剥脱卵的胶状外衣，*L. pictus* 用 80 μm 直径筛网，*S. purpuratus* 用 65 μm 直径筛

网。轻轻将卵的上清液透过筛网倒入另一个 600 ml 空烧瓶中,重复 2~3 次,收集最后一次过筛的卵入另一个 600 ml 烧瓶中,让卵静置约 10 min,抽吸去掉人造海水,注入新鲜海水重新悬浮,剥去胶样外衣使大量卵发育同步,给予充足时间让精子快速进入卵表面。

(2) 卵静置在上述人造海水中,同时制备 100 ml 受精膜剥脱溶液,理想温度下由无钙海水中加入 0.01%胰蛋白酶和 12 或 20 mmol/L DTT (12 mmol/L DTT 用于 *L.pictus*, 20 mmol/L DTT 用于 *S.purpuratus*)。制备的溶液应在制备后 30 min 内使用。同时,将 10 μ l 精子加入 10 ml 人造海水达到 1:1000 稀释,混匀悬液。

(3) 轻轻吸出 4~5 ml (约 2 满管移液器) 的静置后去胶洗过的卵 (当它们在 600 ml 烧瓶底层静置时收集) 移至含 100 ml 新鲜人造海水的 300 ml 烧瓶中,加半管移液器 (约 1 ml) 稀释精子,立即在烧瓶中轻轻前后混匀卵 1~2 次,开始计时。取少量等分的卵在低倍镜下检测,受精膜在 1min 内开始从每个卵的一点凸起,加入精子 2 min, 95% 以上的卵的受精膜开始凸起,2 min 内加入等体积的 2 \times 剥膜溶液,并前后轻轻混匀卵悬液 1~2 次,卵在烧瓶中静置于冰上 5~10 min。

(4) 在 10 min 内 (如果卵静置快则更早) 尽量吸尽海水 (至少 70%~80%)。加新鲜无钙人造海水充满烧瓶,将卵暴露在剥膜溶液中 10 min 以上,至少到第一次细胞周期中小泡形成。让卵静置 5~10 min,重复用无钙人造海水洗涤。此时,可用两种方法培养受精卵,数量相对少的卵可在温度适合的有盖培养皿中水浴或孵箱中培养,调节浓度使 50% 平皿表面被卵覆盖;数量多的卵可被培养在 1 L 搅拌烧瓶中。

3. 固定和免疫标记

(1) 计算所需样品的数量,用 -10 $^{\circ}$ C 纯乙醇注满相当数量的 6 孔培养板的孔,保持冰冻至使用。

(2) 提前 2 min 用移液器将盒子从培养皿中取出,在多聚赖氨酸预涂的玻璃盖玻片 (22 mm \times 22 mm \times 1.5 mm) 上混匀。2 min 后用镊子拿起盖玻片,垂直放入装满冷甲醇的培养孔中。操作尽量减少振动,不要让混匀的小滴流出盖玻片,不要将盖玻片倾斜到甲醇中,否则会导致合子细胞的机械损伤。再将盘置于冰上,混匀细胞至少 5~10 min,细胞可被冻存于甲醇中备以后实验用,海胆胚胎可在 -80 $^{\circ}$ C 的纯甲醇中保存 4 年,且可被抗微管蛋白抗体和抗层粘连蛋白抗体成功标记。

(3) 水化细胞,从乙醇中移出盖玻片,迅速去除液体,放入相同的充满 PBST 的 6 孔板中,5 min 后转移盖玻片至含 0.5% 脱脂奶粉的 PBST 封闭液中,37 $^{\circ}$ C 孵育 30~60 min。

(4) 从封闭液中取出盖玻片,迅速去除液体,将盖玻片细胞面朝上放在湿盒内蜡膜上,加 100~200 μ l 适当浓度的一抗室温反应 4~5 h。用持久的记号笔明确标记盖玻片。

(5) 如需要则吸取并保存抗体, PBST 中分别洗 3 次盖玻片 15~20 min 以上,顺序从充满 PBST 的 6 孔板中转移盖玻片。洗涤 3 次后,用吸水纸吸去残余在蜡膜上的抗体。

(6) 盖玻片细胞面朝上放于蜡膜上,加 100~200 μ l PBST 1:50 稀释的二抗,如果制备 5 ml 或更少的抗体,使用前需微量离心管 10 000 g 离心 3 min 同时吸取上清液使用,避免从微量离心管底部吸取溶液。如果使用大量抗体,用装有 0.22 μ m 孔径微孔滤膜的注射器处理即可。未经澄清的二抗常会导致盖玻片上荧光材料背景污染。37 $^{\circ}$ C 标记细胞 1 h。

(7) 从盖玻片表面吸取二抗,加含 5 μ g/ml Hoechst33258 的 PBST 100~200 μ l,室温孵育 5~10 min。

(8) 迅速去掉盖玻片的水,按照第 (5) 步用 PBST 洗涤。

(9) 用含二次苯基胍/DABCO/CAPS 的培养基将盖玻片封于玻璃载玻片上。从冰箱取出等量上述培养基达到室温。取一滴滴于干净盖玻片中间,放一些 no1.5 的盖玻片碎片在培养基周围以支持盖玻片,减少卵的变形。用镊子从最后的 PBST 洗液中取出盖玻片,小心用吸水纸沾干背面。颠倒盖玻片使细胞面朝下,盖在有培养基和碎玻璃片的载玻片上。用指甲油封好盖玻片固定, -10 $^{\circ}$ C 或 -80 $^{\circ}$ C 冰冻保存盖玻片。载玻片在冰冻状态下可保存数星期,但也应尽快照相,立即照最好,1~3 d 内常也可以。因为随时

间的延长,一些荧光素会淬灭,尤其是长期保存时极易发生。

4. 细胞骨架实验 在第一次细胞循环中,微管的动力学行为很容易受大范围药物处理的控制。为构建一个典型的细胞学骨架破损模型,需要 *L.pictus* 合子经氨基甲酸酯除垢剂 CIPC 处理 (图 15-1)。受精海胆卵的第一次细胞循环大约需要 1.5 h 完成,受样品和培养温度的影响时间略有不同。在此期间,微管结构进行一系列显著的结构再形成活动,将原核聚集形成有丝分裂纺锤体,见表 15-2。

准备 100 mmol/L CIPC [N-(3-氯仿) 氨基甲酸酯] 二甲基亚砜的储存母液。该溶液在室温可保存几周活性,但非数月。在加精子前,每 100 ml 卵培养物里加入 1、10 或 100 μ l 的 CIPC 母液,分别获得 1 μ mol/L、10 μ mol/L 和 100 μ mol/L 浓度。如前所述,将 CIPC 加至所有人造海水和无钙人造海水中,受精并培养卵细胞。固定并免疫标记,将 CIPC 处理的胚胎和对照胚胎的微管方式进行比较 (只用等量的 DMSO)。在每一时间点的细胞垢剂异常将会引起不同细胞骨架损害,1 μ mol/L CIPC 反应小或无反应,10 μ mol/L 明显改变,100 μ mol/L 处理后导致肉眼可见的破坏和分裂形成。

5. 注意事项

(1) 多聚赖氨酸用于以下步骤制备多聚赖氨酸包被的盖玻片。放数百个 22 mm×22 mm×1.5 mm 的盖玻片入烧瓶中,杯中含热水和标准实验室去污剂,浸泡 5~10 min,间断搅拌。倾倒入去污剂,热水仔细淋洗至少 10 次,最后用蒸馏水淋洗。弃蒸馏水后加 95%乙醇完全浸没盖玻片,蜡膜封顶后储存。为包被盖玻片,取出足够盖玻片放在纸盒内,吸水纸擦去盖玻片表面的酒精直到“吱吱”响。待完全干燥后,在一半盖玻片的一面滴加 10~15 μ l 1 mg/ml 多聚赖氨酸的小滴,颠

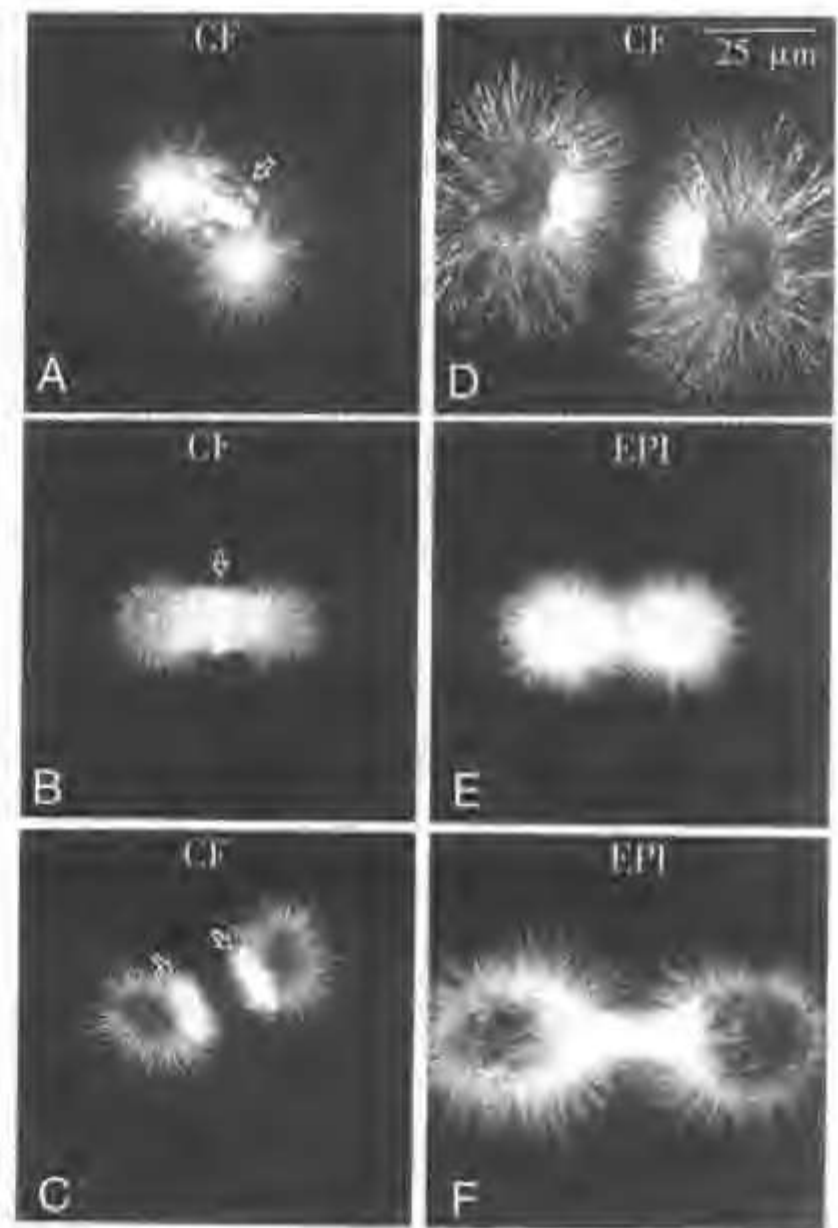


图 15-1 CIPC 处理的受精卵 (A~D) 和 Triton X-100/甘油提取的标本 (E, F) 首次细胞周期有丝分裂的共聚焦显微镜检查 (CF) 及普通荧光显微镜检查 (EPI)。A (前期): 初期的纺锤体极 (spindle pole) 与染色质块。B (中期): 注意纺锤体的棒形 (clublike) 外观, 缩短的星形微管。C (后期): 星形微管再缩短, 染色体排列成异常的宽板状。D (末期): 微管相当致密, 但不能穿透皮质的大部分周围区, 用 10 μ mol/L 或更高浓度的 CIPC 处理的胚胎, 常无法完成细胞动力学观察。E、F 在冷丙酮固定前用 Triton X-100/甘油提取的对照受精卵, 但未用 CIPC 处理, E 为中期, F 为末期, 注意末期纺锤体微管骨架的扭曲 (与图 15-2F 比较)。A~D 用 E7 抗 β 微管蛋白显示微管, 用 Hoechst 显示染色质

表 15-2 *L.pictus* 18℃第一次细胞循环发育和细胞骨架标志

0~5 min	精子合并
5~10 min	精子星状体开始形成, 精子相关的中心体物质轻微显现
10~20 min	精子星状体体积迅速增长, 原核靠近两侧, 母性中心体物质沿核周出现, 尤其是精子核
25~35 min	原核分裂, 中心体物质完全包绕在合子核周围, 此阶段末期微管两极中心体形成
45~55 min	合子核的染色质出现更明显的同源性, 微管形成条状, 中心体物质沿条状微管延长
55~65 min	染色质开始浓缩, 微管形成纺锤体, 中心体物质围绕在核周围, 在纺锤体极聚集
65~75 min	前期发展到前中期, 中心体物质完全分离并定位于各自的纺锤体极
75~80 min	中期
80~85 min	后期
85~95 min	末期和胞质分裂

倒另一半盖玻片盖在小滴上，形成一对干净面对干净面的盖玻片“夹心面包”。放置 5 min 后将每对盖玻片分开，湿面朝上放在纸盒里。检查每个盖玻片湿面：如果残余赖氨酸很快形成一串串紧密的小球则丢弃之，这表明表面不干净，卵不会很好粘附。保存那些赖氨酸大面积均匀扩开的，有一些小的收缩也可以使用。

(2) 一些研究者喜欢用注射器通过口缘膜将 0.5 mol/L KCl 注入海胆体腔内，去掉口可看清性腺。这种途径可释放更多的配子。创伤性更强的去口方法可导致伴随卵释放的色素增多，尤其是 *S.purpuratus*，如果不洗掉会抑制受精。

(3) 此外还有许多改进的方法剥脱受精卵的膜，包括使用尿素和 ATA 代替胰蛋白酶、DTT。ATA 方法很方便，无需另配剥脱溶液。固定和免疫标记质量对分泌到卵表面的透明蛋白的出现十分敏感。胰蛋白酶、DTT 方法处理后，在无钙的人造海水中培养对去掉这些物质十分有效，以上过程完成后会使成像效果更理想。

(4) 海胆胚胎显微镜准备的改良方法可以使用含甲醛的固定剂，固定前取出卵和胚胎。直接用乙醇或甲醇固定常会产生理想的形态效果，但大型号的卵在普通荧光显微镜下的免疫标记细胞骨架成分成像呈“泥样”（图 15-2A, C, E）。为解决这一问题，已建立一种提取法用常规显微镜更清晰地观察细胞骨架，然而这会造成明显的人为影响，最可靠的形态学图像还是用乙醇或甲醛直接固定。乙醇固定更合适免疫细胞化学，与共聚焦结合使用时会产生良好效果。

(5) 稀释一抗，37℃ 孵育 1 h 标记效果理想，呈强特异性标记和低背景。以下的孵育时间和温度标记效果大致相同：37℃ 孵育 1 h，室温 3~5 h，4℃ 过夜约 16 h。个人认为，室温 3~5 h 效果最佳，室温过夜标记强度明显增强。加一抗前使用的多种溶液可“封闭”非特异性蛋白结合位点，包括牛血清白蛋白 (BSA) 和 10%~20% 正常的山羊血清。然而，0.5% 脱脂奶粉是已建立一种提取法用对所有抗体都有效的封闭液，特别简便且经济。

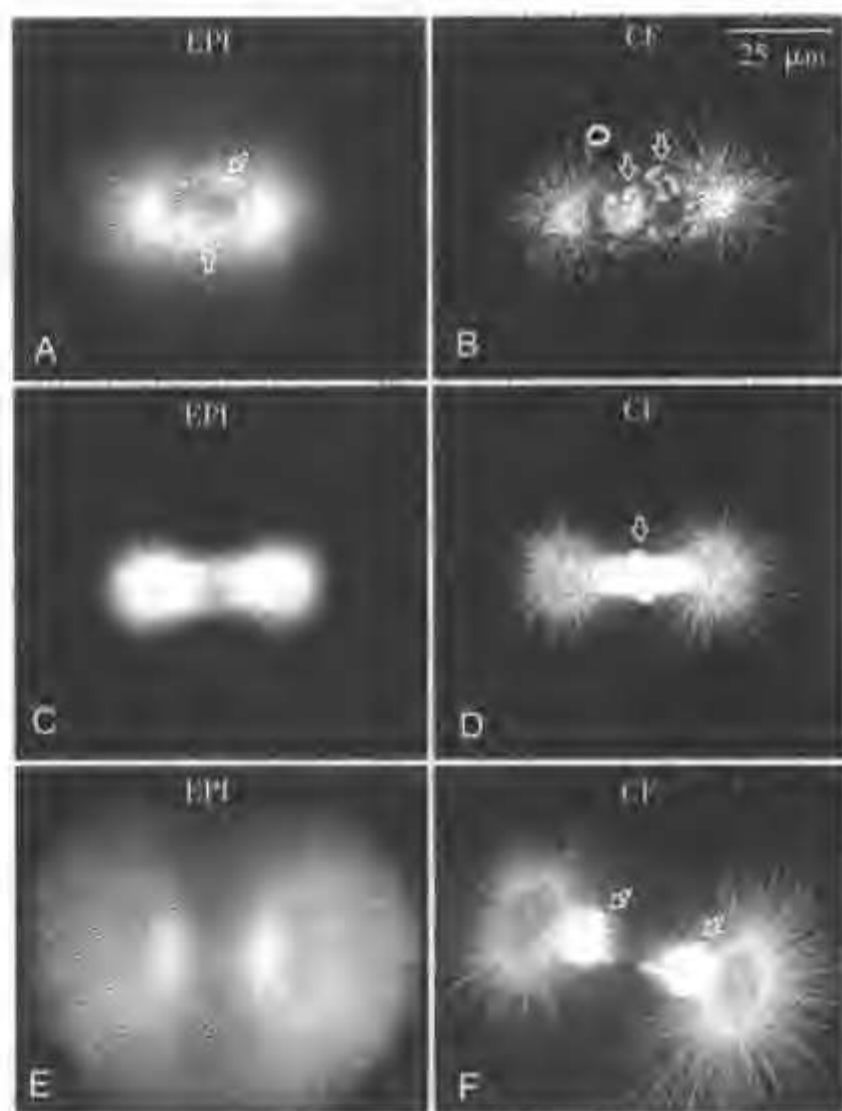


图 15-2 普通荧光显微镜 (EPI) 和共聚焦显微镜 (CF) 观察的首次细胞周期有丝分裂 A、B 为前期，C、D 为中期，E、F 为后期。所有标本都用冷甲醇浸泡固定，并用 E7 抗 β 微管蛋白显示微管，用 Hoechst 显示染色质。除 C 和 E 外，所有图像都进行两次曝光。注意 CF 图像的清晰度和细节都比 EPI 图像好

第十六章 完整胚胎活细胞共聚焦成像

单个细胞和组织是如何协调构成发育胚胎的结构仍是发育生物学研究的一个重要问题。其在形态发生过程中,可能存在大量多样的细胞行为:单个细胞可能改变形状或分离、移行至不同区域,或改变形成方式。整个组织层可能在表面扩展,折叠腔化成三维结构。例如,在鸡胚神经管形成过程中,神经上皮从扁平细胞折叠成有空腔的管状。神经管形成神经系统各区域,神经嵴细胞从神经管背部中线出现并迁移成周围神经系统。以上例子中这些细胞和组织的活动是动态的,时间范围上从几分钟到几天,覆盖的范围从几微米到几毫米。

细胞如何“知道”去向何方,何时迁移和分化,以及如何改变形态才能达到整体协调。普通光学显微镜只能对薄的组织切片或培养的细胞贴片进行观察,对完整胚胎和厚切片无法进行研究,因此对观察成像技术提出了更高的要求。

由于具有对厚样本标记结构深部成像的能力,共聚焦可使细胞和组织能在其固有的环境中成像。各领域研究人员已经利用共聚焦的光学切片能力来探索活组织中很大范围的生物学现象,例如从海生无脊椎动物胚胎的 Ca^{2+} 动力学到哺乳动物神经组织的培养组织切片的轴突和树突的生长。因为共聚焦不须固定和洗涤样品,所以它能够理想地记录不同时间间隔细胞和组织动力学,这正如同反复观察不断进展的建造的整体结构,而不是仅仅检测其终产品。时间间隔建立在一个空间和临时参照的框架之内,要求不可视的基因表达资料和细胞组织动力学相联系。

活细胞的共聚焦检测对移植组织或完整胚胎提出了特殊要求,例如保持组织健康的结果,需要与短时间清晰的光学通路相平衡。许多胚胎根据其大小,可被保持在各自的自然环境中成像,如斑马鱼和海胆胚。其他一些不可视的胚胎很难观察,例如生长在不透明的卵或宿主动物体内的脊椎动物如鸡、小鼠和大鼠的胚胎。这种情况下,需要建一个特殊的小室,必须建立染色技术能将荧光染料导入特定的区域,尤其是胚胎内部深层的部位。

第一节 材料和方法

一、材料

1. 胚胎准备

- (1) Howard Ringer 溶液。
- (2) 白蛋白洗涤容器。
- (3) Scotch 磁带 (3M 公司,产品编号: 810)。
- (4) 4.18 和 25 规格针, 1ml 和 3ml 注射器。
- (5) 解剖工具。
- (6) 印度墨水 (Pelikan Fount no. 21143)。
- (7) 滤纸 (Whatman no.1001-150;直径 150 mm)。
- (8) 移液器。
- (9) 巴氏消毒移液器。
- (10) 消毒塑料移液管。

- (11) 70%和 100%乙醇。
- (12) 蔗糖 (Fisher no. s5-500)。
- (13) 快绿 FCF (Fisher no. 42053)。
- (14) 培养基
 - ① 神经培养基 (Gibco no. 21103-015)。
 - ② B-27 添加剂 (Gibco no. 17504)。
 - ③ L-谷氨酰胺 (Sigma no.3126)。

2. 荧光染料

- (1) DiIC₁₈ (3) (分子探针, 产品编号: D-282)。
- (2) DiI-CM (分子探针, 产品编号: C-700, 可固定)。

3. 培养皿及其附属物

- (1) 6 孔培养板 (Falcon no.3046)。
- (2) 培养插件 (Millipore; Millicell-cm, PICM 030 50)。
- (3) 圆形玻璃盖玻片 (Fisher, 产品编号: 48380 080; 直径 25 mm)。
- (4) 纤粘素 (Fibronectin, 产品编号: F-2006)。
- (5) 硅树脂油脂 (Dow Corning no.79810-99)。
- (6) 焊接工具。

4. 显微镜及热绝缘组件

- (1) Bio-Rad MRC-1024 倒置式共聚焦显微镜。
- (2) 光学磁盘记录仪 (Panasonic no.TQ-3038F)。
- (3) 可擦写式光学磁盘。
- (4) 培养加热器 (Lyon no.115-20)。
- (5) 纸板。
- (6) 热绝缘板 (Reflectix; 5/16 英寸厚)。
- (7) Velcro (McMaster-Carr no.9489k 65.3/4 英寸)。

二、方法

1. 完整鸡胚移植技术 完整鸡胚移植技术可将完整鸡胚及其周围的胚盘整体移植并成功显示胚胎早期的五个体节 (图 16-1)。培养细节如下。

(1) 将胚胎从卵中取出前约 1 h, 准备培养插入膜。用 200 μ l 纤粘素 (fibronectin) 溶液 (20 μ g/ml 纤粘素溶于 Ringer 溶液中) 预先涂于膜表面也有助于保持胚胎固定于原位, 并使膜表面透明。膜厚 200 μ m, 有直径 0.4 μ m 的孔。将培养插入膜放置于有盖培养皿中, 盖好以防溶液蒸发。剩余培养皿轻微倾斜, 使多余溶液流至一侧。

(2) 从卵中取出胚胎, 用滤纸剪一个椭圆形的纸环。使纸环内径足够大以覆盖整个胚胎, 其外径可覆盖几乎所有胚盘周围。将椭圆形纸环覆盖于胚胎上, 剪去纸环周围部分。用镊子将纸环从卵上移开, 胚胎吸附于其上, 被置于 Ringer 液中。用镊子从纸环上取下胚胎, 轻柔地用吸管吸 Ringer 液洗涤胚胎表面, 去除多余的卵黄片和印度墨水。

(3) 胚胎放入插入膜之前, 用吸管吸掉膜表面多余纤粘素溶液, 用塑料移液管将完整胚胎移至培养膜上。

(4) 用镊子轻轻将周围胚盘和胚胎扩展至膜上, 用吸管去掉多余溶液, 随溶液流动用吸管将移植胚胎放置成嘴侧或尾侧, 使胚胎保持沿嘴尾轴的直线状态。这就自然地扩展了移植组织而无须使胚胎扁平, 可减少胚胎卵黄囊正常伸展的胚盘的张力。

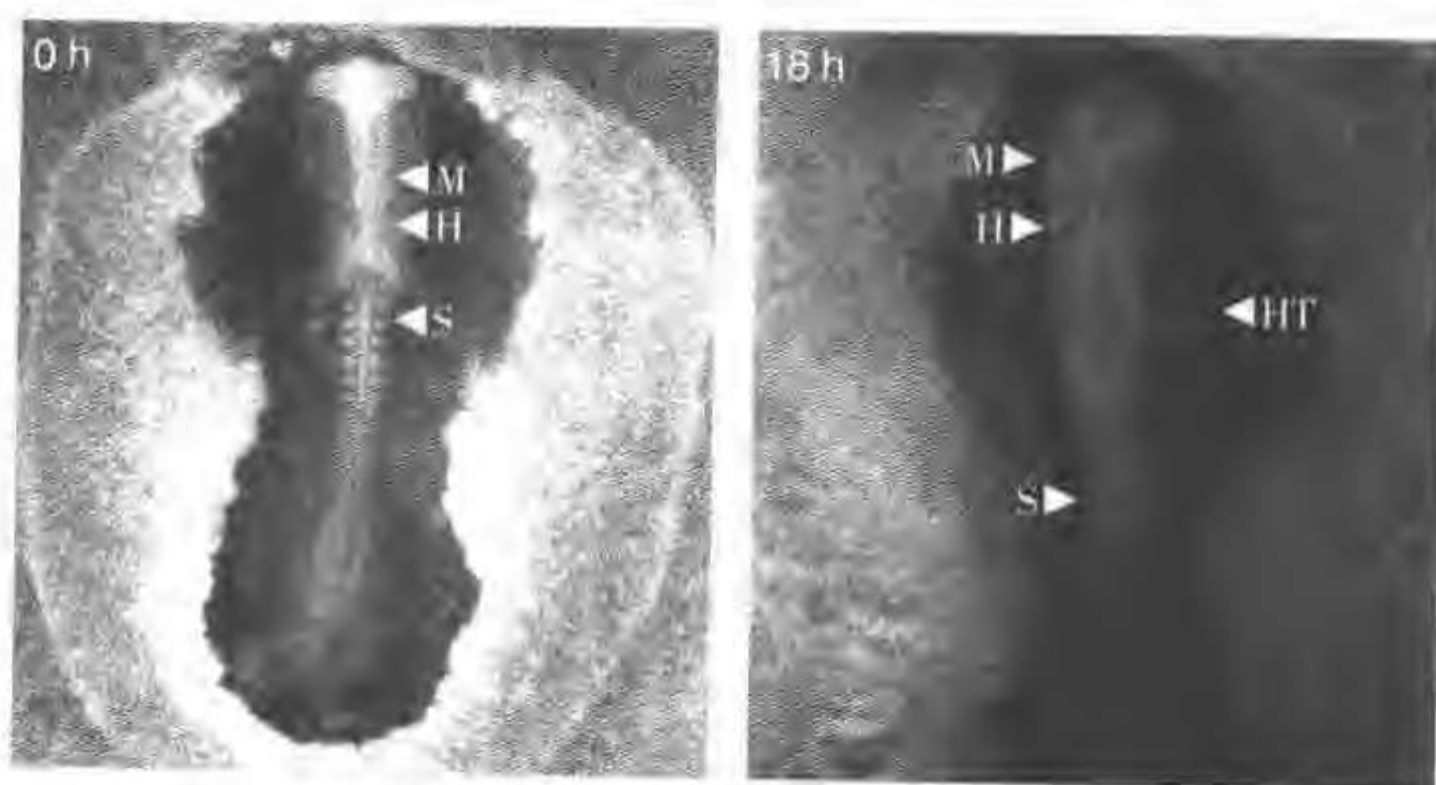


图 16-1 整个鸡胚移植培养，完整鸡胚外植体背侧向下贴在培养插入膜上。0h，显示 9 体节胚胎；18h：在延时（time-lapse）成像期后，从 6 孔板去掉培养插入物倒过来观察胚胎外植体的背侧。胚胎外植体已经发育到 21 个体节。某些解剖学特征进行了标记。包括中脑（midbrain, M）、后脑（hindbrain, H）、心脏（heart, HT）和体节（somite, S）

(5) 培养完整和健康的鸡移植胚胎的最好的培养基是神经培养基（Gibco）组成的培养基 98 ml、B27 添加剂（Gibco）2 ml 和 0.5 mmol/L L-谷氨酰胺。

2. 鸡胚移植的培养盒 鸡胚移植的方法基于封闭式培养盒，最初是为鸡神经管外植体设计的光学成像系统。将该培养盒进行改进后，可使用直立和倒置共聚焦显微镜观察鸡胚的形态发生。该封闭盒取材于塑料 6 孔培养板（Falcon），带有培养插入物（Millipore）和装有胚胎的培养系统（图 16-2A）。

(1) 为增加移植组织在共聚焦成像时的溶解性，6 孔培养板其中的一个孔的塑料底要用玻璃盖玻片所代替。用焊接工具压一个 5 分钱银币于塑料底外侧，切下一个整齐的孔，用细砂纸磨平切面，以沾 70% 乙醇的纸巾擦去碎屑。在孔内侧面沿孔边涂上硅树脂，贴上圆形玻璃盖玻片封住孔。

(2) 为了准备 6 孔板培养胚胎，盖玻片作底的孔要填上 1.5 ml 组织培养基，其他孔填 2/3 的消毒水。在培养插入物下的三条支撑腿使膜从盘底升高 1 mm，让培养基通过 0.4 μm 孔吸收至膜上。其他孔里的消毒水在培养板密封时提供含水空气。

(3) 培养插入物放入孔中后，用蜡膜（5 cm×40 cm）沿四周封闭，孔板为胚胎提供良好的含氧气和水分的环境，可保持 1-2 d）。

(4) 为保持显微镜台 37 $^{\circ}\text{C}$ ，将其封闭在热绝缘盒中，该盒的壁用纸板构成，修剪成适合显微镜使用的大小。每个纸板用热包裹物覆盖（反射绝缘）。Velcro 条被放在合适的位置以便安装、拆卸。绝缘盒要建得足够大以便放入 1-2 个培养加热器（Lyon）。加热器在成像前约 1-2 h 打开使台子和样品逐渐升温。绝缘盒前方的孔由板覆盖，可提供目镜视野并调节焦距和胚胎位置。

(5) 对于倒置显微镜，通过胚胎的光路首先通过玻璃盖玻片，再通过组织培养基和膜，然后再到胚胎（图 16-2B）。因此，在移植胚和物镜之间的工作距离应稍大于 1 mm，即限制使用低倍物镜（小于或等于 10 \times ）或长工作距离配高倍物镜。因为需要长时间的观察并保持胚胎形态，所以用一些工作距离来换取培养插入膜上的组织生长。

3. 直立显微镜培养盒的调节 为使上述物体成像，使用同样设计的密闭盒，但要升高培养插入物，以便胚胎更接近孔板的顶部，缩短工作距离。以下描述直立显微镜培养盒基本设计的调节。

(1) 以与上述步骤（1）同样方法完成第一步。首先改变培养盒设计，在 6 孔板的一个孔的盖板上溶一个洞，洞内侧贴一个盖玻片。将提高直立式显微镜成像的分辨率。

(2) 该孔内适当放入一个塑料有盖培养皿，直径稍小于孔内径，贴于孔内，确保培养皿边缘与孔顶端相平。

(3) 去掉上部 2/3 培养物，仅留下膜的支持物和膜上约 2 mm 的塑料孔。细砂纸磨平孔顶部并封闭，轻轻吹掉所有碎屑。用 1 ml 培养基填充有盖培养皿，其他孔加消毒水。使用 1 ml 培养基使孔中调整后的培养插入物高约 2 mm。

(4) 膜上胚胎的放置参照完整鸡胚移植技术的 1~5 步，培养插入物可被放入培养孔中。

(5) 使用直立式显微镜的一个基本问题是，观察活样品时需要预热的环境。这样会在成像通路上的胚胎表面上方形成水滴凝结。在使用 6 孔板时，水滴可在贴附于 6 孔板盖子上的盖玻片上。为减少盖玻片表面的水滴凝结可使用两层盖玻片之间夹入预热油层的夹心法。确保培养插入物顶部 24 mm 的盖玻片各角均有硅树脂油。在盖玻片顶部滴一点预热的显微镜浸油，顶部轻轻盖上盖子，使浸油在盖玻片上扩展而不会超过培养插入物的边缘，将玻片保温并防止表面形成凝结。

(6) 约 2 mm 的工作距离与插入的显微镜盒几乎一致，因此，其优点是从其上成像，成像通路只穿过玻璃和培养膜（图 16-2C）。在共聚焦显微镜下已经观察了早期鸡胚神经系统发育期间的不同时间间隔的细胞和组织动力学成像。

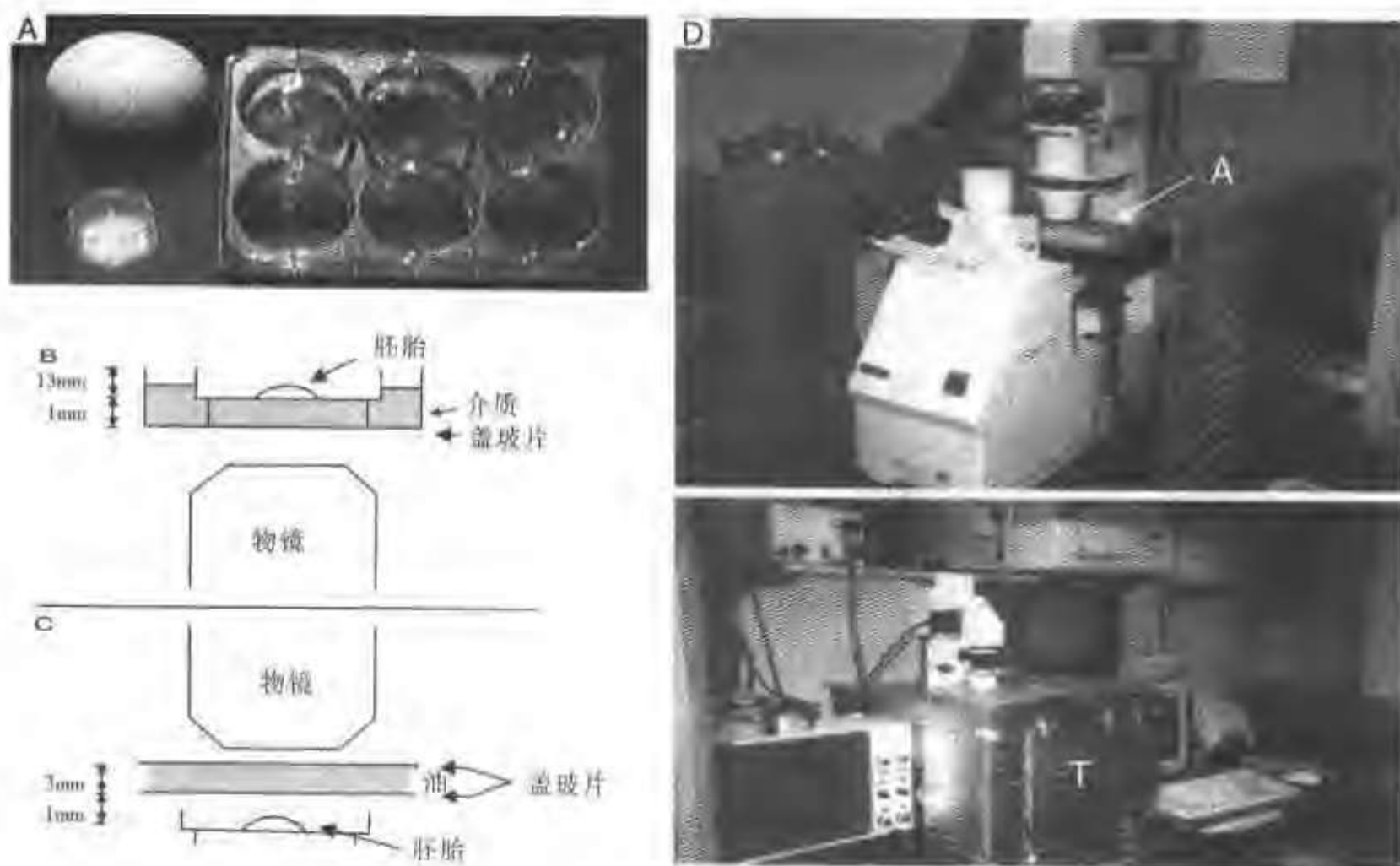


图 16-2 培养盒组成和显微镜检查装置 A: Millipore 培养插入物和 Falcon 6 孔培养板; B: 倒置显微镜检查的模式图; C: 直立显微镜检查的模式图; D: 共聚焦倒置显微镜，在镜台上有 6 孔板 (A) 和保温盒 (T)

三、注意事项

1. 组织培养和培养盒设计要点 保持胚胎或组织的健康和完整，同时获得共聚焦下最好的分辨率，在温度控制条件下供氧、加水和组织培养基时，为将胚胎保持在原位。在共聚焦显微镜的工作框中，对不同大小和形状的胚胎以及活细胞的维持都对成像的培养技术提出了不同要求。为满足活体成像的需要，已发展了许多不同的培养技术。从简单的密封的培养皿，到复杂的机器创造的装置，可允许同时进行生理参数的测定。培养盒要求能将组织维持较长时间以获得完整的生物学指标。因此，应根据实验要求进行培养盒的设计。

2. 胚胎和组织生长 培养盒的设计有三个重要原则。第一, 必须为胚胎或组织提供机械的支持, 以便生长和成像的定位保持; 第二, 必须可以给组织提供营养; 第三, 必须为样品提供清晰的光通路。培养时, 胶原胶或琼脂板 (在琼脂上切的孔或沟以培养胚胎) 均要满足以上要求。确保培养膜上的孔足够大以便养分通过, 湿润时可透明, 且足够薄以便图像通过, 琼脂可与培养基混合。

3. 保持胚胎和组织的定位 组织要保持定位以防沿 X-Y 平面上的飘浮或在 Z 方向上移出焦点。然而还要允许正常活动和经受正常的压力。例如, 胚胎和组织会因热膨胀而漂移, 或因组织培养基的流动而漂移, 或由于自然活动而移动。为减少漂移, 膜表面或胶板应预先涂上粘附细胞的物质。涂层可为纤维粘素溶液或血浆凝块, 或玻璃表面的双面胶。胚胎或组织还可以固定在其他材料上, 如滤纸或组织上的面。嵌入琼脂中的组织可使组织保持在原位, 并可用来限制细胞活动或组织相互作用。

4. 保持胚胎清晰的光通路 胚胎和物镜之间的光通路应尽可能视野清晰, 最大可能减少光通路的散射和失真。用于插入胚胎的或用于维持营养的培养基都应透明的。指示剂染料会增加荧光背景。去除气泡、卵黄片或任何胚胎周围非自然的碎片。最好用玻璃代替光路上的所有塑料。

5. 保持组织的氧分和水分 在封闭盒内应有保存水分和营养的蓄水池。再循环或充满应在以下基础上考虑, 如需要维持组织的设计长度, 组织是否需要一个稳定的环境, 变化所需的新养分的添加。以上对维持胚胎定位是应综合考虑的问题。

6. 温度控制 多种胚胎正常发育要求保持恒定的温度。将显微镜和单侧加热器周围的热绝缘盒以及商品化的含微传感器的加热器连接于自动温度控制系统。尤其在高倍条件下, 要注意减少温度波动和振动引起胚胎的飘浮或影响图像的稳定性。

7. 物镜放大倍数和工作距离 制造一个可调节各类显微镜物镜的盒子十分重要。物镜前方表面和样品之间的距离称为工作距离。盒子的设计应使工作距离最小化且最大限度地观察组织发育。多种开放式盒子的设计可使高放大倍数的水物镜直接放入培养基样品表面。然而封闭式盒子常出现塑料盖可能限制工作距离。如果要求观察细胞行为的小细节, 考虑高倍物镜和短工作距离很重要。10× (NA 0.25~0.30) 物镜的工作距离是 2~3 mm, 40× Neofluar NA 0.75 工作距离可能小于 1 mm, 长工作距离 (LWD) 物镜的使用可能会损害图像质量。用低倍镜调焦可放大细节, 进行一定地补偿, 但仍存在对图像质量的限制。

8. 其他类型的培养盒 观察水生胚胎如海胆或斑马鱼时, 在水下保持胚胎定位的方法已得到发展。在玻璃盖玻片上涂上厚的鱼精蛋白硫酸盐可使海胆卵贴附其上, 并可停留在塑料有盖培养皿上面切的洞里。斑马鱼胚胎可放入琼脂板上切的三角形孔中, 用薄琼脂板轻轻盖在卵上使其保持原位。

9. 鸡胚移植物的共聚焦成像 鸡胚发育的 2~3 d, 有两个可区分的阶段性过程。在鸡胚背部, 神经管形成 7 个重复节段, 称作菱脑原节 (rhombomere)。它作为一种空间参照物, 使细胞可感受到自身的位置并分化为特定的神经元。它还众多迁移细胞亚群的形成提供定位, 如头部神经嵴细胞从神经管迁移形成周围神经系统, 但仍不清楚形成菱脑原节的细胞机制, 神经嵴细胞如何“知道”何时离开神经管以及去向的机制也不明确。虽然分子基因表达资料正在很快揭示这一切, 仍非常需要提供空间和时间参照框架将分子和细胞学资料联系起来。

10. 倒置显微镜 用上述培养盒能对神经管形成的菱脑原节 (rhombomere) 进行成像。倒置显微镜可装备热绝缘箱, 包绕在培养加热器和显微镜周围 (图 16-2D)。通过照射胚胎背侧面, 穿透的光线成像将揭示神经管壁的轮廓。图 16-3 显示典型胚胎移植前后 10 h 时间间隔的神经管成像。注意神经管如何扩展并收缩在适当的位置以将神经管分隔成阶段状。菱脑原节的形成需要 15 h 以上, 此后, 神经管开始回到不明显的阶段性结构。仍不清楚为何培养 10~15 h 后明区成像开始变得模糊。随时间的延续, 可观察到整个菱脑原节节段分成两个时间间隔序列。每 5 min 将典型的数码成像记录在光盘上 (Pinnacle), NIH 成像 1.60 被用于活动时背部成像。用 10× Neofluar NA 0.30 光路完全开放, Z 轴分辨约为 30~40 μm。

应用荧光共聚焦显微镜将染料标记的神经细胞动态成像, 图 16-4 显示了典型的鸡胚外植体神经嵴细胞迁移过程。将荧光染料注入神经管腔标记将迁移的神经嵴细胞, 可以示踪单个神经嵴细胞从神经管

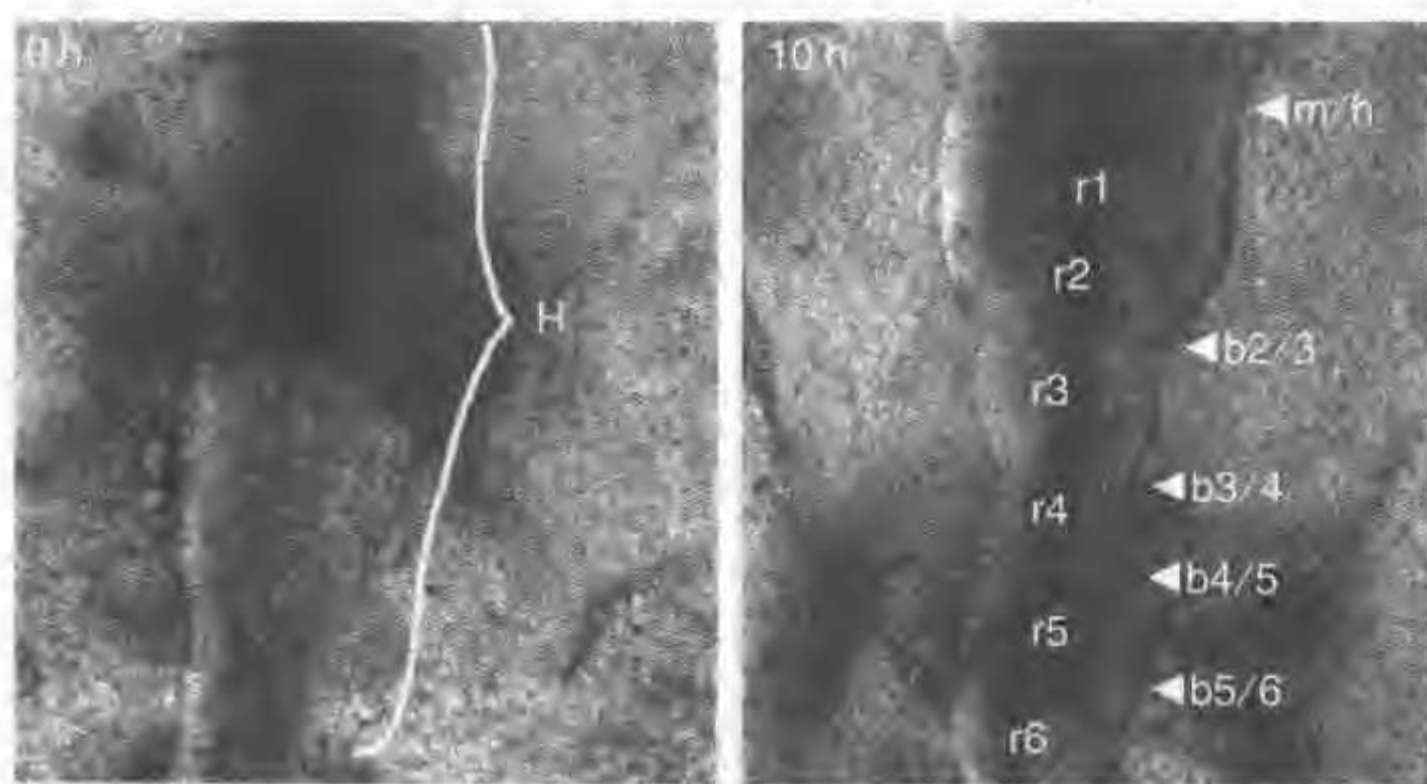


图 16-3 后脑分节的亮视野成像。0 h: 神经管的后脑 (H) 似乎无明显分节; 10 h: 神经管形状改变, 形成后脑的分节状结构。菱脑原节 r1~r6 及其他的边界区域进行了标记, 如位于 r2 与 r3 之间的边界标记为 b2/3, 中脑和后脑之间的边界标记为 m/h

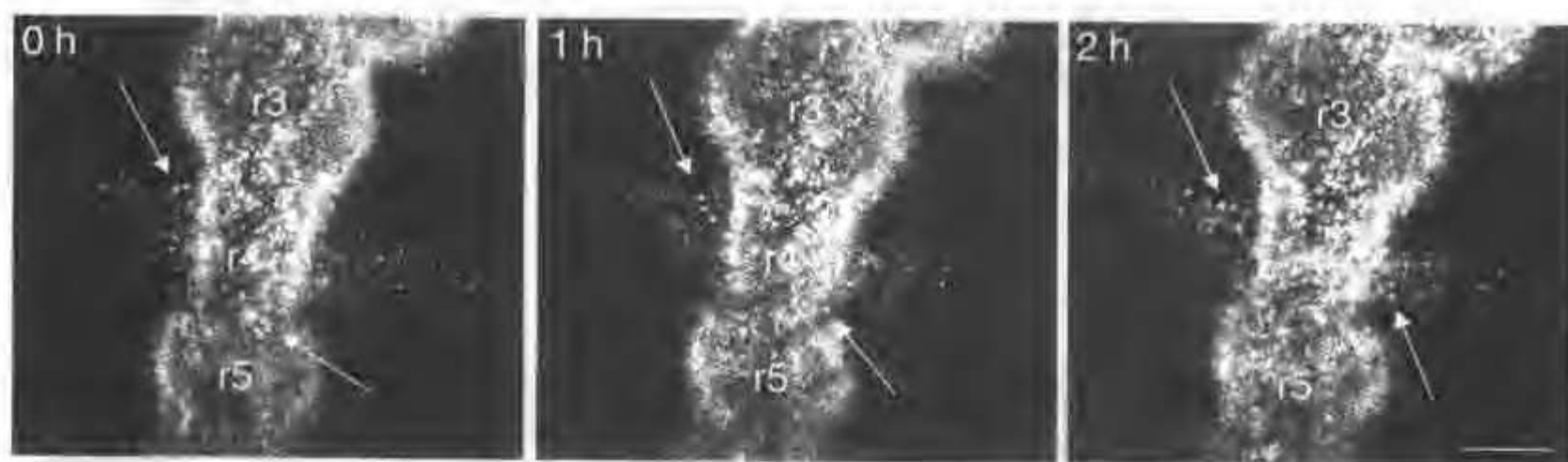


图 16-4 荧光 Dil 注射入神经管标记神经管和神经嵴内的细胞, 显示标记的细胞向周围未标记组织迁移的情况。箭头指示离开菱脑 r3、r4、r5 区域神经管的单个神经嵴细胞。0 h: 上方箭头指的是已经离开神经管加入邻近 r4 区域细胞群的一个神经嵴细胞, 而下方的箭头指的是靠近 r4 和 r5 交界处的一个细胞; 1 h: 下方的箭头显示该神经嵴细胞已经迁移到 r4 区, 同时上方的箭头显示其他的神经嵴细胞已经迁移的离神经管更远; 2 h: 下方的箭头显示神经嵴细胞正从神经管迁移出来加入邻近 r4 区域的周围组织

出现迁移至周围未标记组织的轨迹。使用 10× Neofluar NA 0.30 物镜和 zoom 在 1~2 之间观察单个和小细胞群, 10~15 h 时间间隔后出现的模糊并未影响成像, 时间间隔成像持续 18 h 以上。鸡胚早期发育的第二个阶段性过程产生重复的相邻时间对的细胞群或体节。体节的形成是沿头尾轴规律向下顺序形成的, 体节使肌肉、脊柱和皮肤发生。同样观察体节从发芽到单个细胞群的形成过程。图 16-5 示典型鸡胚外植体的体节形成。在图上 4.5 h 有三对新体节形成。在 10 h 的延时成像过程中, 观察到约 7 个新体节, 每 5 min 在光盘上进行数码成像记录。使用 10× Neofluar NA0.30 提供较大视野以获得最新体节形成和未分区的部分。

11. 直立式显微镜

已经发现培养鸡胚的背部在膜上会有效减少其正常滚动。在头部, 这种滚动使胚胎背神经管倒至侧面。神经嵴细胞离开脊神经管后顺利地迁移, 其途径是从背侧面绕到腹侧面。这种滚动自然暴露胚胎的侧面, 可更多地追踪颅侧的神经嵴细胞到达鳃弓的过程以及它们的迁移途径。通过采用共聚焦显微镜的光学切片功能, 可在每个时间点采集多达 10 张 Z 轴切面, 每张 10 μm。可捕获许多神经嵴细胞, 延时成

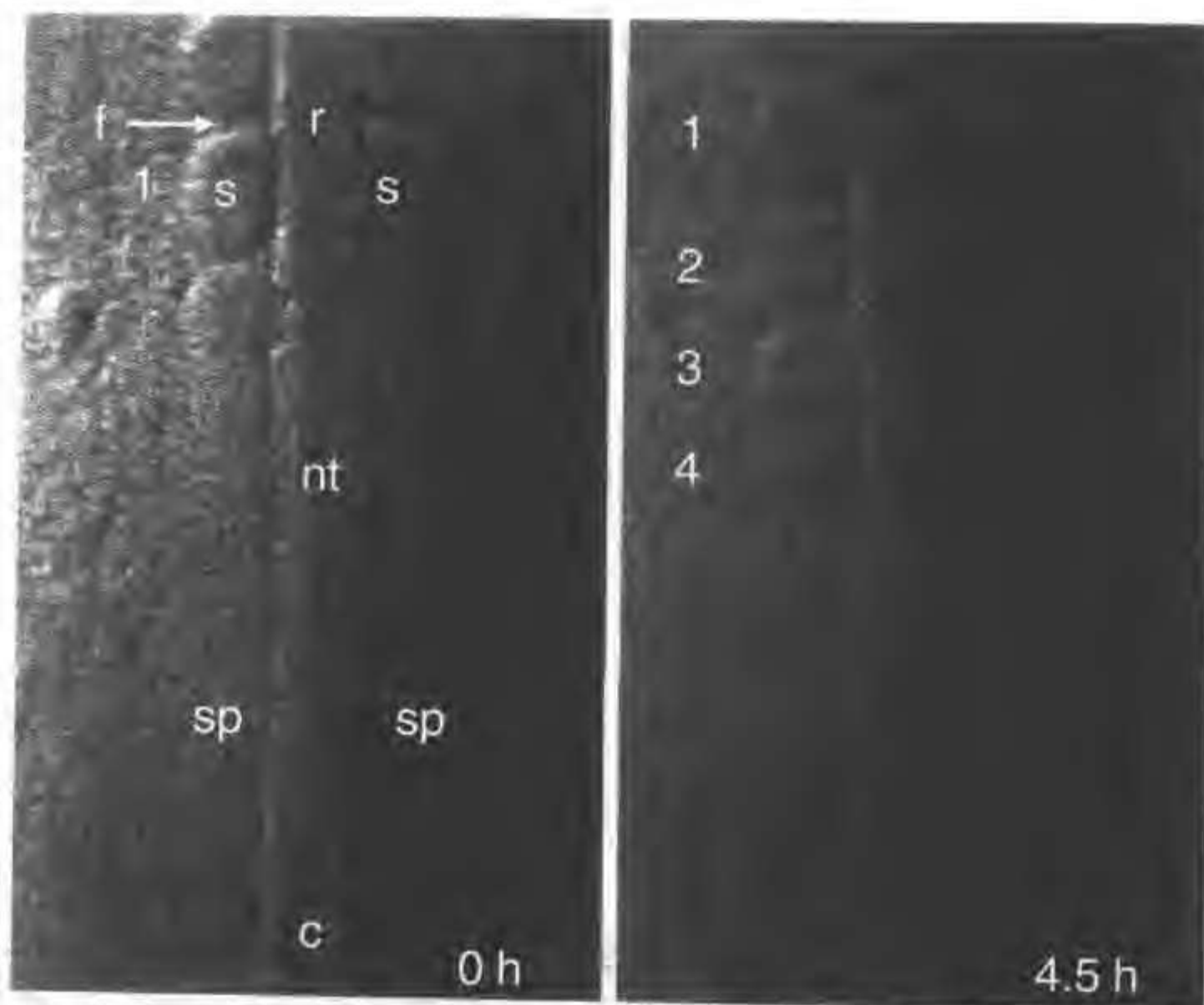


图 16-5 体节形成的亮视野成像。0 h: 1 表示最新形成的体节对。4.5 h: 第四体节对已经形成, 在图像的顶部是胚胎的喙部分 (r), 并可见体节间的沟 (f), 不分节的区域称为节板 (sp), 图像的底部是胚胎外植体的尾部 (c)

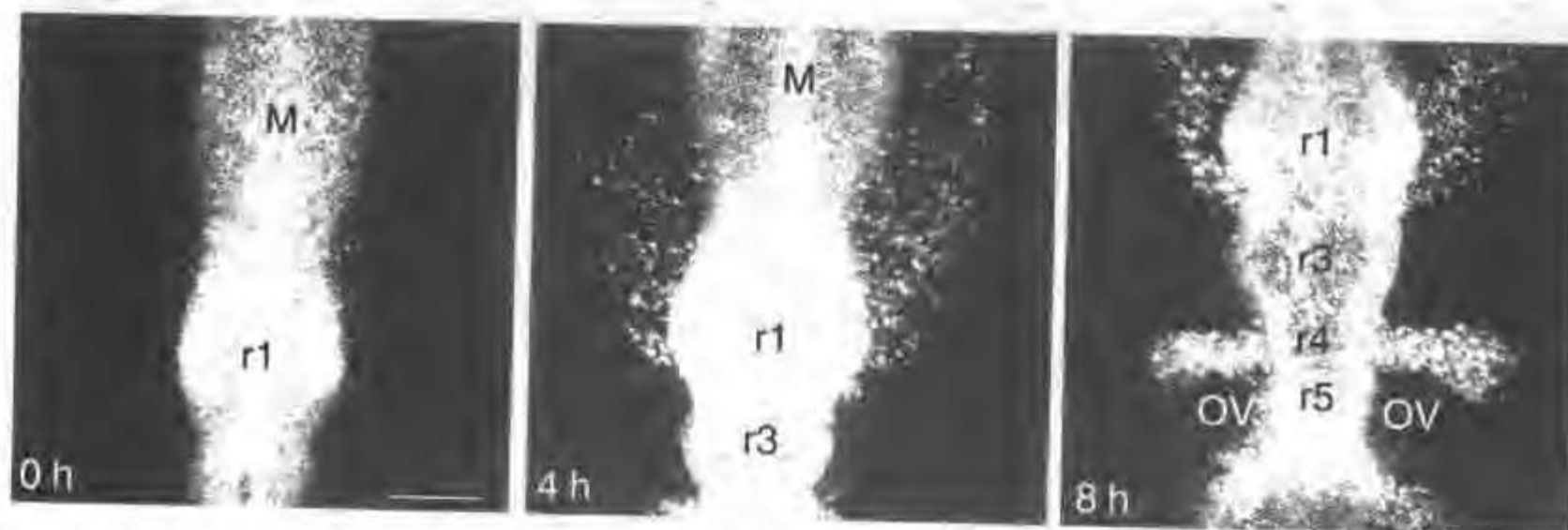


图 16-6 Dil 标记的神经嵴细胞和神经管内的细胞, 胚胎外植体背侧朝向培养膜。每张图像由 10 幅图像叠加形成, 每张 10 μm 。0 h: 后脑区荧光标记的神经管; 4h: 来自中脑和菱脑 1 区的神经嵴细胞迁移进入周围未标记组织; 8 h: 神经嵴细胞继续从中脑和菱脑 1 区迁移。胚胎外植物的自然生长暴露了尾侧菱脑, 来自 r5、r6 区的其他迁移的神经嵴细胞移向接近 r4 的区域

像可达 24 h。图 16-6 显示当胚胎外植体开始转向左侧时, 颅侧的神经嵴细胞图像。经 4 h 延时后, 大量神经嵴细胞已经离开中脑和菱脑原节的 r1 区神经管。8 h 后, 生长中胚胎的喙侧自然发育显示出靠近 r4 区和尾侧到耳囊的神经嵴细胞图像。将荧光成像记录在光磁盘记录仪上 (OMDR; Panasonic)。每 2 min 时间间隔成像持续 24 h。使用 OMDR 可快速播放, 并明确时间间隔中显微镜或标本是否需要调节。每 2 min 将数码成像记录在光盘上, 使用 NIH 成像 1.60 播放运动中成像。

本节概述了完整胚胎活细胞成像的要点, 包括结合共聚焦显微镜如何保持组织的健康和形态改变方

面的问题,例如胚胎和成像之间的协调。讨论了鸡神经发育过程中细胞成像和组织动力学工作的多个范例,尤其是详细讨论了鸡胚如何生长在培养膜上保持正常发育,直至胚胎正常转动阶段。在培养膜上预先涂上纤粘素溶液有利于细胞和组织粘附于膜表面和孔上。在塑料处使用玻璃盖玻片,湿润时使培养膜透明以便成像通路尽可能清晰。培养盒另外的孔保存消毒水,培养基被放至培养膜下面以造成湿润和营养丰富的环境。虽然封闭的培养盒的设计限制了物镜和低倍、高倍和长工作距离的选择,但仍可观察到感兴趣的球形和定位细胞的活动。另外,准备简便易行的培养盒缩短实验时间。6孔板提供多余孔来培养其他胚胎移植,使我们选择两个胚胎移植成像,非成像胚胎可视为完整胚胎生长,允许一个时间间隔成像中进行两个实验。使用轴外照明来观察明区鸡神经管和体节。这可以改进三维重建轮廓成像的质量。对荧光显微镜成像,尽可能使用激光低能设置有助于防止样品漂白并可延长成像时间。应用最高的中性密度过滤器并调节量和反差,以便图像在尽可能宽的0~255黑白比例成像。一旦成像出现缺点,可以通过增加样品的激光量来减少激光束的损失。我们常使用10×Neofluar NA0.30来观察细胞运动并发现更好的结构,通过增加zoom而非转到20×LWD物镜。设定完全开放孔,虽然这种转换导致共聚焦观察的视野缩小,但却能增加共聚焦的敏感性,且允许最大的厚光学切片,能长时间获取细胞运动轨迹。从电离子渗透法标记少量细胞到大量组织的渗透,有多种荧光标记技术,还有不同混合物高效标记到细胞的各部位。我们荧光标记多组脊细胞,通过加压注射大量染料入神经管,发现DiI缓冲液加入热蔗糖[10 μl DiI溶液[0.5 mg DiI C₁₈(3) 在1 ml 100%乙醇] 在90 μl 0.3 mol/L蔗糖]标记神经嵴细胞和神经管细胞效果很好。加少量快绿(<1 mg 在100 μl的染液中)入染液中更容易观察注入神经管的染料的成像。总之,活组织成像的事先计划能节省时间、避免操作误差、简化系统、使调节更方便。最后,寻找有效的培养盒和共聚焦设置,可带来更多的实验的便利,并有利于观察不同动物系统的胚胎细胞和组织动力学。

第二节 激光扫描共聚焦显微镜在哺乳动物胚胎发育研究方面的应用

有关哺乳动物胚胎早期发育的研究开始很早,主要是利用光学显微镜对胚胎的发育过程进行形态观察。随着体外受精技术等生物技术的不断发展,人们可以很容易地得到不同发育阶段的胚胎,为相关研究提供了极大的方便,使得有关方面的研究取得了飞速进展,极大丰富了哺乳动物胚胎早期发育的理论。但到目前为止,有关哺乳动物胚胎早期发育的机制还不清楚,仍有许多问题需要探明。对这些理论进行深入研究不但可以丰富相关学科的理论,而且可以为哺乳动物体外受精、转基因动物、克隆动物等相关生物工程技术的研究提供理论依据,促进相关技术的发展,因此有关方面的研究一直是相关研究领域的研究热点。

近年来人们结合电子显微镜在亚显微水平上开始进行研究,以便进一步了解胚胎发育过程的形态变化以及影响胚胎发育的因素。在利用光学显微镜对胚胎早期发育进行的研究中,由于光学显微镜的分辨率较低,当胚胎发育到桑椹胚期以后很难看清单个胚胎细胞以及细胞之间的相互位置。电子显微镜具有很高的分辨率,可以详细观察细胞的亚显微结构,但由于用透射电镜观察时需对胚胎进行切片观察,因此在胚胎整体结构的研究上存在不足。利用扫描电镜虽然可以观察胚胎外表面的整体结构,但不能看到胚胎内部细胞的相互关系。由此可以看出利用光学和电子显微镜对哺乳动物早期胚胎的发育进行研究尚有不足之处。

随着现代生物研究仪器设备的不断创新,激光扫描共聚焦显微镜的出现填补了光学和电子显微镜的不足之处。使用特异的荧光探针标记胚胎细胞内各种结构后进行观察,可以得到细胞或胚胎内部微细结构的荧光图像。利用这一设备对胚胎发育过程进行研究,不但可以分辨出每个细胞的形态,而且可以利用断层扫描的特点掌握胚胎细胞的整体特征,这就为相关研究提供了新的方法。

利用这项技术不但可以观察胚胎早期发育过程中细胞整体及亚显微结构的变化过程,同时利用免疫

组织化学的方法还可以对早期胚胎发育过程中一些蛋白质因子的表达时间及部位进行观察,如利用免疫组化的方法结合共聚焦显微镜研究胚胎早期生长因子及其受体的表达,能够较为精确地定位生长因子在胚胎细胞中的表达,进一步推断生长因子对胚胎的作用方式。另外还可以利用特定的荧光探针对胚胎发育过程中细胞内各种离子浓度以及PH值的变化进行观察,通过这些研究可以从分子水平就哺乳动物胚胎早期发育的机制进行深入研究。目前采用上述方法进行的相关研究刚开始起步,激光共聚焦显微镜技术的应用将会对这一领域研究的不断深入产生积极的推动作用。

下面就利用激光共聚焦显微镜对早期胚胎进行研究的一些方法做一大概介绍:

1. **胚胎的固定** 将所收集到的胚胎置于1%的PBS-BSA中洗涤3~4遍,转入0.2%的链酶蛋白酶中消化大约1~2 min,待见到透明带开始向外膨胀,迅速取出放入PBS滴中,直至透明带全部消化,然后置于1%PBS-BSA中洗涤2~3遍,放入4%的多聚甲醛中室温固定25~30 min,根据胚胎的发育阶段,适当调整固定时间,以免染色过程中卵裂球的脱落。

2. **胚胎细胞内微管的荧光标记** 微管的荧光标记参考Charles等的方法,并加以修改。主要过程为:将固定后的胚胎在PBS+1%TritonX-100内渗透处理1 h,然后用PBS-Tw (PBS+0.1%Tween 20)洗涤。将渗透处理后的胚胎移入封闭液(PBS+2%BSA+2%山羊血清+2%脱脂奶粉+0.15 mol/L甘氨酸)内处理30 min,然后用PBS-Tw洗涤。

将上述处理后的胚胎进行荧光标记,具体标记方法为:

(1) 将胚胎与一抗(将1:1的 α 和 β 微管单克隆抗体按1:600溶于PBS-Tw)在37℃下共培养2 h,或在4℃下过夜培养,然后在PBS-Tw内用脱色摇床洗涤1.5 h。

(2) 将胚胎与二抗(山羊抗小鼠IgG-FITC按1:1200溶于PBS-Tw)在37℃下培养2 h,然后在PBS-Tw内用脱色摇床洗涤至少2 h。通过上述处理完成对细胞内微管的荧光标记,结果显示如下(彩图7A)。

3. **胚胎细胞内高尔基体和内质网的荧光标记** 将固定后的胚胎用PBS-Tw洗涤,然后分别与5 μ g/ml NBD C₆-ceramide (标记高尔基体)或5 μ g/ml DiOC₆ (3) (标记内质网)在37℃下标记10 min,然后在PBS-Tw内洗涤1 h。可在胚胎细胞内显示出明显的高尔基体分布(彩图7B)。

4. **胚胎细胞生长因子及其受体表达的观察** 胚胎固定后转移到PBS-Tw中充分洗涤,室温条件下放入10%的山羊血清封闭液(PBS+2%BSA+10%山羊血清+2%脱脂奶粉+0.15 mol/L甘氨酸)中1 h以上,然后洗涤2~3次,进入到不同生长因子的一抗(PBS-Tw按1:10稀释)中,37℃孵育2 h以上或4℃过夜。一抗孵育结束后,经充分洗涤转入二抗[用PBS-Tw按1:(200~400)稀释]中,37℃下孵育2 h以上,注意避免强光照射。孵育结束后,同样经充分洗涤,结束前20 min左右加入0.5% PI,在暗盒中进行核染色。结果在囊胚期胚胎中显示出明确的表皮生长因子受体分布(彩图7C)。

5. **胚胎的激光扫描共聚焦成像系统观察** 将标记后的胚胎移入PBS+20%甘油+100 mg/ml DABCO (Sigma)+2.0 μ g/ml Hoechst33342 (Molecular Probes)的封片液内,置于载玻片上,盖上盖玻片并用指甲油封住,4℃暗盒保存。制备好的样品置于激光扫描共聚焦成像系统上进行观察记录。

第十七章 用荧光探针进行基因表达分析

多标记免疫荧光技术和激光扫描共聚焦显微镜的出现,使得在生物医学领域的研究手段大大加强。最近,对于标记单个细胞或动物组织中的细胞多用遗传学工具进行标记。这些工具主要应用在果蝇研究方面,而且通过大量商业化的抗体,如 myc 抗原、CD-2 蛋白等在其他生物如线虫 (*caenorhabditis elegans*) 和斑马鱼都已经进行细胞谱系实验。那些表达 β -半乳糖苷酶或 GFP 的细胞用交联荧光团的葡聚糖标记,或用脂溶性荧光染料,如 DiI 标记,并可用内源性蛋白质的相应标记研究细胞内这些标记物的表达。

本章主要叙述样品制备方法、样品的单标记和多标记、利用激光扫描共聚焦显微镜进行分析的方法,主要以果蝇的整装片实验为例。果蝇成虫板(盘)是幼虫前体到成熟组织如眼、触角、翼和腿的过渡阶段。活着的幼虫成虫板位于体内,进行抗体染色时成虫板分割成几部分。而且,这种技术可被广泛应用于许多其他标本,如全胚整装片(脊椎或无脊椎动物)或切片材料。最近,Patel 成功地在果蝇胚胎中显示了神经细胞的类型,并通过全胚的抗体染色显示了相当出色的细节。

第一抗体可通过不同的方式、在不同的动物种类中产生。多克隆抗体常以亲和层析的方式纯化,但也有许多用于免疫荧光标记的抗体是一种粗制的抗血清。单克隆抗体可通过组织培养的上清液或腹水液制备。用于激光扫描共聚焦显微镜技术(LSCM)的抗体应通过多次实验确定最佳的使用浓度。由于 LSCM 的敏感性高,因此某些抗体的使用浓度常较低(稀释度较高)。对于多标记实验,确定每种抗体的稀释度尤其重要。因为蛋白质溶液是细菌良好的培养基,如液体中不加入叠氮钠、硫汞钠(thimerisol sodium),易引起细菌的生长繁殖。加入叠氮钠的终浓度为 0.2 g/L,在制备抗体溶液后(对于再水化的抗体或冻干的抗体)应尽快加入。如不确定是否存在这些抑菌剂,可加入叠氮钠作为预防。

应用 LSCM 的最大优点是可进行多种荧光标记以检测样品中不同的物质。本章详述了来源于不同种类动物的第一抗体(如兔和小鼠)和来源于同一种动物的第一抗体(如小鼠)进行多种荧光标记的方法。除此之外,对特定的亚细胞结构结合的荧光染料的使用方法也进行了描述,并引入多标记实验过程中。初步讨论了果蝇视盘细胞物质的共存(共表达)和遗传学标志分析。

多标记实验的样品制备如下所述。在进行多标记实验前,每种抗体在工作浓度都应通过实验加以确定。而且,在三标实验中,使各种抗体信号互相匹配仍非常重要,尤其是在一种蛋白的表达明显比另一种强或一种第一抗体的滴度明显比另一种抗体高时。保证每种抗体各种实验条件的一致非常重要,如固定、封闭和缓冲液。在多标记实验中,注意以上细节将增加实验成功的机会,而且在失败的情况下,也容易找出失败的原因,利于总结经验。一些可能出现的问题,如抗原表位固定的配伍禁忌或试剂存在交叉反应等,稍后详述。

大量的抗体是来源于兔或小鼠,对于多标记实验,应用来源于不同种属动物的抗体比应用来源于同一种动物的第一抗体(如两种单克隆抗体)有明显的优点。应用同种动物来源的抗体,应对每种抗体分别加以染色。尽管这种方法存在不足,但也是一种值得尝试的方法。另外,分不同步骤进行多种抗体的多标记实验,比同时进行多种抗体的标记实验有一定的优点,可克服某些试剂存在交叉反应的问题。本章的分步标记实验,在同一切片上应用了两种单克隆抗体,抗 myc (ATCC) 抗体和抗-22C10(一种果蝇神经抗原)的抗体,两种抗体都是组织培养的上清液。分步进行的单克隆抗体标记实验也可成功应用在标准的免疫组织化学抗体标记。

一、材料

(1) 10×PBS (1L): 18.6 mmol/L NaH_2PO_4 (2.56 g), 84.1 mmol/L Na_2HPO_4 (11.94 g), 1.75 mol/L NaCl (102.2 g)。此储存液在室温下稳定。制备 PBS 工作液, 可用去离子水进行 1:10 稀释, 并将 pH 用 NaOH 或 HCl 调至 7.4。PBS 工作液也可在室温下保存很长时间。

(2) PEMF 固定液: 0.1 mol/L PIPES (pH6.9) [1 mmol/L EGTA, 2 mmol/L MgSO_4 , 1.0% 诺乃清洁剂 P-40 (NP-40)], 该液体可作为储存液在室温下保存。在每次实验前加入甲醛 (根据抗原不同, 其终浓度为 20~40 ml/L)。通常用 37 g/L 含有甲醇的甲醛。对于甲醇敏感的抗原表位, 应使用 Polysciences 公司的无甲醇甲醛 (商品目录号 No.04018)。

(3) PBS-PFA 固定液: 4.0% 多聚甲醛 (PFA), 1×PBS。称 4 g PFA 加入 90 ml 去离子水, 加热至 50℃~60℃, 在搅拌情况下加入 PFA (最好在通风橱进行)。加入 10 μl 10 mol/L NaOH 静置 10~20 min, 使液体澄清。当所有 PFA 溶解后, 加入 10 ml 10×PBS 储存液。加入仍残留少量不溶性的物质, 可用滤纸过滤。用 pH 试纸测定溶液的 pH 值, 不要用 pH 计, 以免 PFA 污染电极, 用 HCl 调节 pH 至 7.4。溶液在玻璃瓶中于 4℃ 避光保存, 此溶液最长可保存 1 个月的时间。

(4) PLP 固定液: 20 g/L PFA, 0.01 mol/L NaIO_4 , 0.075 mol/L 赖氨酸, 0.037 mol/L Na_3PO_4 (pH7.2), 80 g/L PFA 溶液的制备方法与 PBS-PFA 溶液的配制方法相似, 将 PBS 换成水即可。PFA 溶液冷却后, 将 0.36 g 赖氨酸溶解在 10 ml 水中, 加入冷冻的 7.5 ml 0.1 mol/L Na_3PO_4 (pH7.2), 2.5 ml 0.1 mol/L Na_2HPO_4 。在应用前, 将 15 ml 缓冲赖氨酸溶液和 5 ml PFA 混合, 并加入 50 mg NaIO_4 。该溶液每次应用时即时配制, 并在冷却后加入标本。

(5) 封闭液: 50 mmol/L Tris (pH 6.8), 150 mmol/L NaCl, 0.5% NP-40, 5 mg/ml 牛血清白蛋白 (BSA), 4℃ 保存。该溶液只要无细菌生长, 可一直应用。加入终浓度为 0.2 g/L 的叠氮钠后, 其储藏期限可达数月。该溶液也适用于基于 PBS 的缓冲系统。封闭液为: 1×PBS, 5 g/L NP-40, 5 mg/ml BSA。洗涤缓冲液: 1×PBS, 5 g/L NP-40, 1 mg/ml BSA。封片缓冲液: 1×PBS, 100 ml/L 甘油。

(6) 洗涤缓冲液: 50 mmol/L Tris (pH 6.8), 150 mmol/L NaCl, 5 g/L NP-40, 1 g/L BSA, 4℃ 保存。该溶液只要无细菌生长, 可一直应用。为防止细菌生长, 可加入终浓度为 0.2 g/L 的叠氮钠。

(7) 封片缓冲液: 50 mmol/L Tris (pH 8.8), 150 mmol/L NaCl, 100~900 ml/L 甘油, 室温储存。由于甘油可引起细菌生长繁殖, 因此储存容器应高压灭菌。

(8) 5×p-苯二胺 (PDA) 储存液: 将 30 mg PDA 溶解在 4 ml 去离子水中, 加入 6 ml 100% 甘油, 充分混合。分成若干等份, 尽可能避光保存在 -20℃。制备工作液时, 在每次使用前, 将储存液用 50 mmol/L Tris (pH 8.8) 和 150 mmol/L NaCl 稀释 5 倍即可。时间太长, PDA 溶液 (包括储存液和工作液) 不稳定 (数周至数月), 尤其是在甘油量少于 800 ml/L 的情况下更是如此。因此, 此溶液最好每周配制一次。PDA 可由 Sigma 公司购得 (商品目录号 No. P1519)。

(9) n-丙基没食子酸盐封片液: 5 g/L 丙基没食子酸盐, 700~800 ml/L 甘油, 用 PBS 工作液配制。丙基没食子酸盐溶解于 PBS, 加入甘油, 充分混合, 等分后储存于 -20℃。该溶液比 PDA 溶液更稳定 (在 4℃ 或室温下储存数周至 1 个月方变色)。该溶液可从 Sigma 公司订购 (商品目录号 No. P3130)。

(10) DABCO 封片液: 25 g/L DABCO, (700~800) ml/L 甘油, 用 PBS 工作液配制。将 DABCO 溶解于 PBS 中, 而后加入甘油, 充分混合。等分后储存于 -20℃。该溶液也比 PDA 溶液稳定。DABCO 可从 Sigma 公司购得 (商品目录号 No. D2522)。

二、方法

(一) 标本制备

(1) 第三龄幼虫或蛹用 PBS 工作液略洗后, 去除所有食物。它们可能粘在表皮 (几丁质) 上。

(2) 将几条幼虫移入含有凹陷的载玻片中, 凹陷中加有新鲜 PBS。每条幼虫用细镊子 (Dumont 5#,

Fine Science Tools Inc., 商品目录号 No.11250-20) 沿前/后轴切开, 尾部不要, 头部从里面翻出。眼/触角盘和 6 个腿板(盘)中的 4 个通过胶质与脑和中枢神经系统相连。翼板、halter 板和余下的 2 个腿板附着于体壁并通过胶质与中枢神经系统相连。脂肪、消化道组织和涎腺用镊子仔细去除, 余下的是成虫板(imaginal discs)、中枢神经系统和头部几丁质。将该结构移入含有 1 ml 冷固定液的 48 孔培养板。每孔可放置 20 个, 将几丁质用作“把柄”以使用镊子进行操作。

(3) 根据分割虫体年龄的不同, 这些结构固定的时间略有差别(幼虫 20~30min, 蛹 2 h), 应在冰上固定。根据抗原性的不同, 选择不同的固定剂: PEMF: 常用于固定核蛋白; PLP: 常用于固定细胞表面和细胞外的蛋白质, PBS-PFA: 固定细胞核、胞浆内和细胞外的蛋白质都有较好的效果(固定液的配方见上)。此处仅简述固定液的选择, 相应的详细内容可参考本书有关章节。某些细胞外的蛋白质用 PEMF 可得到良好的保存, 某些核蛋白用 PLP 也可获得良好的固定。要得到一种抗原精确良好的固定, 往往要经过多次的尝试。一种不失为明智的选择是在固定时选择对大多数抗原有较好固定作用的固定液, 进行新的抗体检测时先用该固定液进行实验(如果蝇成虫板的固定则选择 PEMF 在冰上固定 20 min。), 必要时再改变一些条件和配方, 这对于荧光多标记实验尤其重要。在确定固定时间时, 一个重要的考虑方面就是抗原本身。固定时间太短, 组织或细胞的形态不能得到良好的保存, 可引起背景染色过高; 但如果固定时间过长, 组织或细胞的抗原性将受到破坏, 可能造成抗原信号过低, 甚至无法检测到抗原信号。因此, 固定时间的长短必须根据经验确定。另外, 固定液的种类、浓度、样品固定时间的长短等都有影响。在使用和选择固定液时, 应综合考虑以上因素。

(4) 固定后, 用封闭液孵育组织, 防止第一抗体的非特异性结合。成虫板应在冰上或 4℃ 封闭至少 45 min。通过将这些结构移到含有 1 ml 封闭液的另一个 48 孔板完成。封闭步骤可长达数小时, 延长封闭时间, 对抗体染色的质量无明显影响。BSA 或动物全血清都可用来封闭非特异性抗体的结合, 在某些抗体染色过程中, 两者可同时使用。常用 1~5 mg/ml 的高质量 BSA(片段 V, Sigma Chemical Co.), 动物血清的常用浓度为 10~100 ml/L, 一般情况下用任何一种都足够了。

(5) 如用动物血清作为封闭剂, 一般选择与二抗来源相同的同种动物血清。例如, 二抗是山羊抗小鼠 IgG(当然, 此时的一抗是小鼠来源的单克隆抗体), 则选择正常山羊血清作为封闭剂。尽管选择封闭血清时, 选择与二抗来源动物相同的血清基本没有危险, 但假如封闭血清中含有二抗可以识别的 IgG 分子, 则可造成非特异性背景染色。血清应加热至 56℃ 保持 30 min 以灭活补体。将血清趁热用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 分装后保存于 -20℃ 无霜冰箱。在果蝇实验中, 固定和封闭之间的洗涤步骤可以省略, 因为成虫板仅有几个细胞直径的厚度, 当标本在各溶液间转移时很容易达到平衡。但对于较厚或较大的组织, 一般在固定和封闭步骤之间要经过 2~3 次(5~15 min) 洗涤步骤。同样地, 在成虫板标记的任何步骤中都不需要搅拌, 但对于较大的组织或胚胎, 要获得良好的高质量的抗体标记, 则需要在振荡器上轻轻搅拌或振洗, 也可将标本放入密封试管, 通过不断开关离心机中进行洗涤。

(6) 果蝇的成虫板可在实验时新鲜制备(包括分割、固定和封闭), 但对于大多数其他标本则应提前制备并储存备用。如果蝇胚胎和斑马鱼胚胎固定后用乙醇或甲醇保存在 -20℃ 无霜冰箱, 标本可保存数周至数月。有报道称在 -20℃ 保存 1 年的标本仍可获得良好的荧光免疫组织化学染色结果。对于那些对乙醇敏感而固定时间长短对其影响不大的抗原, 这些标本可在固定液中保存在 4℃。所有储存的标本在应用第一抗体染色前, 都应经脱水、洗涤和封闭处理。另外, 切片材料应提前制备, 进行抗体染色前, 石蜡切片在室温下储存, 冰冻切片材料则保存在 -20℃。大块组织或胚胎则需要在固定、封闭和抗体染色的各个步骤中加入 10 ml/L DMSO(二甲亚砜, Sigma Chemical Co. 商品目录号 No. D5879)。

(二) 荧光单标记技术

(1) 在果蝇成虫板经固定和封闭后, 将它们移入放置了适当稀释度的 48 孔板中。因为第一抗体的量有限, 常用 400 μl, 4℃ 过夜。对于在较低浓度使用的抗体, 初次用中间稀释度较为合适(用水溶性缓冲液稀释)。这种溶液应在 4℃ 稳定至少数周, 溶液中加入终浓度为 0.02% 的叠氮钠。抗体标记实验是否

成功的重要影响因素之一是第一抗体的浓度。应经多次实验以确定最佳的抗体浓度,初次实验时,最好选择一系列不同抗体浓度进行染色。多克隆抗体和腹水常使用的稀释度一般在 1:100~1:50 000。来自于杂交瘤细胞系组织培养未稀释的上清液的抗体,其稀释度一般为 1:500。如果用未稀释的杂交瘤上清液染色只能获得较弱的阳性结果,则应将上清液进行浓缩,可使用 Centricon 蛋白浓缩仪(Amicon,商品目录号 No.42409)进行浓缩。以这种方式至少可得到 50 倍的浓缩液。第一抗体孵育的时间也有较大差别:如信号较弱,可将孵育时间延长至 24 h,甚至更长;如背景染色过深,在 4℃或室温下,第一抗体的孵育时间应缩短到 1 h。

(2) 成虫板洗涤 5 min ×4,可用镊子将它们在 4 个孔中移动漂洗,每孔含 1 ml 洗涤缓冲液。洗涤在 4℃进行。洗涤前,回收第一抗体以备再用,一般可使用 3 次或 3 次以上。有时,某些抗体反复使用 5 次仍可获得明确的阳性反应结果。稀释后的第一抗体的储存方法与中间稀释度抗体的储存方法相同。非特异性抗体信号可通过第一抗体的预吸收加以降低。对多克隆抗体的染色尤为有用。用水溶性缓冲液将抗体稀释 4~5 倍,加入固定后的标本,轻轻混合后孵育 1 h 或过夜。预吸收后,吸去抗体溶液,并稀释至合适的浓度或加入 0.02%的叠氮钠后 4℃保存。将用于预吸收的材料丢弃。过量的第一抗体被洗掉后,在加入第二抗体前,加入一次封闭液也有助于降低背景信号。

(3) 将成虫板移入含有适当稀释度第二抗体的小孔,二抗用水溶性缓冲液稀释,每孔含抗体 400 μl,4℃孵育数小时,对于大标本或厚标本应 4℃孵育过夜。如果二抗是荧光素交联的抗体,样本应加盖或用锡箔遮盖的试管避光进行反应。二抗可通过应用全免疫球蛋白或这些蛋白的片段[如 F(ab')₂ 片段]免疫宿主动物制备。假如已知第一抗体是 IgG 或 IgM,确定选择适当的第二抗体。如果这些资料不知道,许多商品化的第二抗体都可同时识别 IgG 和 IgM。对于大多数研究而言,全蛋白分子可获得良好的染色结果,但针对 F(ab')₂ 片段的抗体有时可降低非特异性的背景染色。第二抗体的最佳工作浓度应根据实验或经验加以确定,制造商建议的浓度可作为参考。许多抗体试剂是冻干状态,并以干粉形式保存在 4℃。根据抗体附有的使用说明重新配制成溶液,并离心除去不溶性物质,将上清液吸取到干净离心管中。抗体应根据制造商的建议加以妥善保存,最好将试剂以一次使用的量为单位进行分装,分装后储存于 -80℃或 -20℃无霜冰箱中。如果试剂在短期内(数周之内)能用完,可在 4℃保存,对染色质量无明显不良影响。最重要的尽量避免试剂的反复冻融,这可引起抗体滴度的迅速降低。大多数情况下,用荧光素交联的二抗染色可获得满意的结果。但应注意荧光素的选择,应根据荧光显微镜或 LSCM 的配置情况选择合适的荧光素。对于 Bio-Rad MRC 1024 LSCM 一般常用的荧光素是 FITC、丽丝胺-罗丹明、Texas Red、Cy5 和 Cy3,最近常用的荧光染料如 Alexa Fluor 系列等。

(4) 标本在 4℃洗涤 5 min ×4。

(5) 如果应用的是荧光素标记的抗体,应使成虫板在封片液中保持平整。如二抗是生物素化的抗体或应用的是夹心法,应将标本移入含有适当稀释度的下一试剂继续染色。通过加入特异性识别第二抗体的另外一种抗体,可使较弱的荧光信号得到加强。在这一方案中,第二抗体是不结合荧光团的抗体,而第三抗体则交联有相应的荧光团。例如:第一抗体如果是小鼠来源的单克隆抗体,则二抗可用兔抗小鼠 IgG,第三抗体用 FITC 标记的猴抗兔 IgG。另外一种抗体标记系统可通过选用生物素化的第二抗体和荧光团交联卵白素(avidin)或链亲和素显示。生物素和链亲和素/卵白素可特异性亲和,一个链亲和素/卵白素分子可结合多个生物素。这种高特异性的结合可以大大降低由于第二抗体的非特异性结合造成的背景荧光染色。这种方法在多标记实验中常用,并可使不同抗体的荧光信号得到加强。

(6) 在 4℃孵育 1~2 h。减少第三抗体溶液的容量,用锡箔将 48 孔板包上,让抗体避光反应。

(7) 标本在 4℃避光洗涤 5 min ×4。以上步骤继续,使成虫板在封片液中保持平整。

(三) 两种或三种抗体可同时进行标记的技术

(1) 两种来源于不同种属动物的第一抗体,如兔抗果蝇 Atonal 多克隆抗体(彩图 3)和小鼠抗 Daughterless(彩图 3),两种抗体同时加入标本。小鼠抗 Daughterless 的稀释度为 1:50,兔抗果蝇 Atonal

多克隆抗体的稀释度为 1:5 000。成虫板在此溶液中 4℃ 孵育过夜。抗体交叉反应的出现主要是由于第二或第三抗体的特异性不强引起的,通常是由于不同种属的免疫球蛋白分子互相识别造成的。第一抗体和第二抗体在进化上越接近的动物,在加入第二或第三抗体后越容易引起交叉反应。尝试应用来源于多种不同动物的第二抗体或第三抗体与 IgG 片段反应,有助于将交叉反应减小到最少。例如,在应用来源于大鼠和小鼠的第一抗体进行双标记实验时,使用的山羊抗大鼠 IgG 和生物素化猴抗小鼠可分别与小鼠或大鼠 IgG 产生免疫反应。在极少数情况下,当应用的第一抗体来源于同一基因家族的不同成员时,也可产生交叉反应。在这种情况下,一种第一抗体常可识别一种以上的不同蛋白质。Atonal 和 Daughtless 都是含有高度相关的双螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix) 结构域的转录因子。但是因为所制备的抗体是采用二种蛋白质相对不保守的区域 (即不含有双螺旋-环-螺旋结构域的部分) 产生的,因此,此处不存在交叉反应的问题。确定是否存在交叉反应,应首先确定用于制备第一抗体的免疫原是否有问题。使所有第一抗体和第二抗体或第三抗体的浓度合适,也是降低交叉反应至最低限度的方法。

(2) 对于单色免疫荧光标记,第一抗体混合液也可回收重复使用,加入叠氮钠后 4℃ 保存。

(3) 成虫板在 4 个孔中 4℃ 漂洗 20 min, 每孔含 1 ml 洗涤缓冲液。

(4) 第二抗体混合液用 400 μ l 水溶性缓冲液配制。在以上的双标记实验中,使用的二抗试剂是 1:200 稀释的生物素化山羊抗兔 IgG (Vector Labs) 和 1:200 稀释的大鼠抗小鼠 IgG (Jackson Immunoresearch)。注意两种免疫荧光信号应通过不同的方法显示。在应用 LSCM 进行多种荧光标记的实验中,如果一种荧光信号非常强的话,常发生向另一波长通道的渗透 (bleedthrough), 看起来类似交叉反应。在这种情况下,图像很像是添加上去的。在两种荧光染料的激发波长相近时更是如此。例如,虽然罗丹明次毒蕈环肽和荧光黄的激发波长光谱相差 80 nm, 但有时可在荧光黄的通道中检测到罗丹明次毒蕈环肽的荧光信号。为鉴别是存在渗透还是抗体有交叉反应,应选择两种激发波长相差较远的荧光染料,如用 Cy5 (激发波长 647 nm) 取代罗丹明。如果一种标记的信号较强,另一种荧光信号的强度较弱或较难以显示,可通过三重或四重夹心法进行增强。也可通过降低较强的荧光信号 (降低第一抗体和第二抗体的浓度) 来平衡不同荧光信号的强度,在 LSCM 分析时,这有助于图像间的补偿。如果一种抗原的固定较差,最好分步分别进行标记。在加入二抗前应对标记较差的抗原加上二次固定和封闭步骤。如果是固定液本身,而不是组织的原因,应尝试使用中等浓度的固定液和去垢剂使两种信号都能得到最佳体现。也可利用亚细胞染料进行多色荧光标记 (如使用罗丹明次毒蕈环肽,它可与胞浆中的 F-肌动蛋白结合)。各种荧光染料的详细描述,包括它们的最佳结合条件、激发和发射波长,可在 Molecular Probes 公司的《荧光探针和研究用化学物手册》《Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals》查到,本书的相应章节也有叙述,请参阅。这些染料常在抗体标记过程的最后加入孵育液中 (二抗或三抗孵育时)。在最后的洗涤步骤中,过量的染料可被洗去。较强的荧光染料如碘化丙啶 (PI) 可与核酸结合,应在洗涤步骤前加入,经多次洗涤以便洗去多余染料。应注意的是,某些亚细胞染料需要紫外光激发,在未配备紫外光激发装置的 LSCM 上无法使用。某些染料,如 PI, 既可与 RNA 结合,也可与 DNA 结合,因此应根据研究目的的不同选择用 DNA 酶或 RNA 酶进行处理,如要进行 DNA 标记可用 RNA 酶处理或加入去垢剂。要得到满意的多标记结果,一般应进行多次实验。

(5) 标本在 4℃ 孵育 1~2 h。

(6) 标本在 4℃ 洗涤 5 min \times 4。

(7) 第三抗体也用 400 μ l 水溶性缓冲液配制。对于以上实验,使用稀释度为 1:200 的罗丹明标记的链亲和素 (streptavidin) (Vector Labs) 和 1:100 稀释的 FITC 标记的山羊抗大鼠 IgG (Jackson Immunoresearch)。

(8) 成虫板在此溶液中 4℃ 孵育 1 h, 48 孔板用锡箔包裹。

(9) 标本在 4℃ 洗涤 5 min \times 4, 48 孔板尽可能用锡箔包裹以避光。按以上步骤进行,而后进行 LSCM 分析。

(10) 对于三标标本, 仅将相应的抗体加入每一抗体孵育步骤, 尽量使三种第一抗体来源的动物种属不同(如兔、大鼠和小鼠)。如果应用夹心法, 注意生物素-链亲和素系统只能使用一次, 并仔细检查以保证在所有的二抗和第三种抗体间无交叉反应。应用来源于同种宿主的多种第一抗体的多重标记实验详述如下。

(四) 两种或三种抗体不能同时进行标记

(1) 样本的分离和处理如上所述。第一种单克隆抗体(在本实验中, 为抗-myc 抗体)用 400 μ l 水溶性缓冲液按 1:5 稀释, 成虫板在此溶液中 4℃孵育过夜。

(2) 成虫板在 4 个孔中 4℃漂洗 5 min \times 4, 每孔含 1ml 洗涤缓冲液。第一抗体可回收重复利用。

(3) 将成虫板移入含有适当稀释度第二抗体的小孔, 此前可进行封闭, 但对于本实验可省略。二抗用水溶性缓冲液稀释, 每孔含抗体 400 μ l, 4℃孵育数小时, 对于大标本或厚标本应 4℃孵育过夜。对于小鼠抗-myc, 用生物素化的猴抗-小鼠 IgG (Jackson Immunoresearch), 稀释度 1:50。

(4) 标本在 4℃洗涤 5 min \times 4。

(5) 如果应用的是荧光素标记的抗体, 则按以上步骤进行, 使成虫板在封片液中保持平整。标本移入含有荧光黄标记的链亲和素 (1:200 稀释, Jackson Immunoresearch) 溶液继续染色。加入罗丹明标记的次毒蕈环肽 (Molecular probes) 进行孵育, 浓度为 250 mol/L。在 4℃孵育 3 h, 这一孵育时间使罗丹明次毒蕈环肽的信号最强。对于多种来源于同一种动物的第一抗体, 可考虑颠倒第一抗体的加入顺序。例如, 应用抗-myc 和抗 22C10 单克隆抗体时, 假如先加入 myc 抗体, 则不发生交叉反应, 但如果顺序相反, 则 22C10 的表达图像可添加到 myc 的表达图像上。

(6) 成虫板在 4 个孔中 4℃漂洗 5 min \times 4, 在此步骤以及以后的步骤, 48 孔板用锡箔包裹避光进行。

(7) 将成虫板移入第二种第一抗体溶液(在本实验中, 为 400 μ l 1:200 稀释的 22C10 单克隆抗体), 4℃孵育过夜。

(8) 成虫板在 4 个孔中 4℃漂洗 5 min \times 4。

(9) 将标本移入含有 Cy5 标记的山羊抗小鼠 IgG 溶液 (1:50 稀释, Jackson Immunoresearch), 主要是用于显示 22C10。

(10) 成虫板在 4 个孔中 4℃漂洗 20 min。

(11) 对于整装片成虫板进行以上步骤获得复合的共聚焦图像。本实验应用成虫板显示了 myc 抗原的表达(彩图 3D, 荧光黄标记)、22C10 的表达 (Cy5 标记, 彩图 3F) 和肌动蛋白的表达 (罗丹明次毒蕈环肽标记, 彩图 3E), 并使得成虫板细胞的形态更鲜明 (彩图 3I)。

(五) 用于 LSCM 分析的标记样品的制备

(1) 在每种标记方法最后的洗涤步骤以后, 将标本移入 1 ml Tris/甘油溶液。对于非常平整的成虫板整装片(尤其是眼盘)应使用 10%甘油。对于其他标本, 如胚胎, 应使用 500~900 ml/L 甘油。防止荧光团快速衰减的化合物是 *p*-苯二胺 (PDA)、*n*-丙基没食子酸盐和 DABCO (1, 4-二氮二环 [2.2.2] 辛烷)。也可购到其他的抗光漂白剂, 如 Slowfade (Molecular Probes, 商品目录号 No.S828)。在标准的荧光团中, FITC 最易发生光漂白作用, 对于 LSCM 应用的各种荧光染料, 使用抗光漂白剂不失为一种良好的方法。

(2) 让标本在室温下甘油溶液中至少平衡 1 h 或在 4℃过夜, 用锡箔包裹避光保存。

(3) 甘油平衡后的样品可在 4℃保存数周或在 -20℃避光条件下可保存数月, 此时甘油的含量应大于 100 ml/L 以防结冰。在抗光漂白剂存在时不能保存太长时间, 因为它们不稳定。

(4) 自由基清除剂可引起荧光信号的减退或光漂白。自由基是由于落射式荧光 (epifluorescent) 或激光的照射产生的, 因此在应用 LSCM 观察和分析前, 应将标本在抗光漂白剂中 4℃或室温下孵育 30~60 min, 注意培养板用锡箔包裹。

(5) 将成虫板分割开并在清洁的载玻片上排列好制成标本。在载玻片上预先放置一大滴封片液,

然后将成虫板移入其中,在移入成虫板过程中注意随时补充封闭液,保持封片液不干燥。

(6) 使用细的钨丝分离针 (Ted Pella Inc., 商品目录号 No.27-1) 将成虫板与余下的表皮 (几丁质)、脑和其他不要的虫体部分分割开。如果需要,成虫板可彼此分开。

(7) 对于平板整装片的制备 (尤其是对眼成虫板),应用镊子将所有不需要的虫体的几丁质去除 (几丁质比成虫板厚),将所有碎片放在一边 (这有利于“收集”不必要的气泡),将所有需要的部分在载玻片排列整齐。

(8) 仔细盖上盖玻片,在此过程中,防止成虫板移动,注意封片液的量要适当,不要太多。

(9) 一旦盖玻片盖好后,就不要再移动。如果封片液不足,应从盖玻片的一侧滴加少量封片液。如果封片液过多,可用滤纸剪成三角形,将滤纸的一端轻轻与盖玻片一侧吸取多余的液体。盖玻片应以一定角度倾斜放下,防止在成虫板周围产生气泡。气泡常聚集在成虫板一侧残留的碎片周围。靠近标本周围的少量气泡,可通过轻轻挤压盖玻片而去除。

(10) 盖玻片应密封,防止封片液的蒸发。指甲油用于密封有较好的效果,但应注意使用无色的指甲油,许多有色指甲油可产生自发荧光。

(11) 在指甲油干燥后即可进行显微镜或 LSCM 观察和分析,标本应在 4℃ 避光保存。

(12) 用 LSCM 进行荧光抗体标记的图像采集、合并和分析

(13) 用 Bio-Rad MRC 1024 LSCM (Bio-Rad Microscience, Hercules, CA) 采集的共聚焦图像见彩图 3。该型显微镜配备氦/氩激光器 (American Laser Co., Ltd., Salt Lake City, UT), 可发射三种波长的光线,分别是 488 nm (用于荧光黄、FITC 等荧光染料的激发)、568 nm (用于罗丹明、Texas Red 等荧光染料的激发) 和 647 nm (用于 Cy5 等荧光染料的激发)。

(14) 采集 8~10 个卡尔曼平均标准化的单个光学切面,以 8 比特的分辨率进行图像采集。

(15) 图像传输至计算机或服务器,可用本身自带的软件进行处理,也可将图像传输至其他计算机用其他图像软件处理。

(16) 彩图 3 显示了两种果蝇成虫板进行多抗体荧光标记的例子。第一个例子是两种核抗体蛋白的双标记结果。彩图 3A 显示了 Atonal 的定位 (红色),彩图 3B 显示了 Daughterless 的定位 (绿色),而彩图 3C 则显示了 Atonal 和 Daughterless 在细胞内的共表达情况 (红色与绿色重合后产生黄色图像)。这种表达方式与标准的免疫荧光有一点重要的差别,所有这些共同表达两种物质的细胞都位于眼成虫板的形态发生沟 (morphogenetic furrow, MF) 的自然凹陷中。此外,由于 MF 中的一些细胞向神经性的光感受器细胞分化,因此它们的细胞核分布在不同平面,与未分化细胞的细胞核位置也不同。通过进行 MF 区域不同平面的光学切面分析,可清晰地显示 MF 中所有表达 Atonal (彩图 3A) 和 Daughterless (彩图 3A) 的细胞。

(17) 第二个多标记的例子显示了纯合的野生型细胞 (彩图 3D 中的亮绿色细胞)、果蝇毛发基因的突变杂合型细胞 (彩图 3D 中的暗绿色细胞) 和纯合突变毛发细胞 (这些细胞无荧光,彩图 3 中的 * 部位)。绿色荧光表示存在 myc 抗原,它们在幼虫细胞的表达标志着这些细胞中含有正常毛发 1~2 拷贝基因的产物。这些马赛克型的眼板也表达另外两种常用的眼发生标志物:单克隆抗体 22C10,它标记未分化的光感受器细胞 (彩图 3F 中的粉红色细胞);罗丹明次毒蕈环肽 (彩图 3E 中的红色细胞) 则与眼板细胞中的肌动蛋白结合,可清晰显示 MF 的位置 (彩图 3C~I)。这些标记物中两种标记物共存的情况如彩图 3G 和彩图 3H 所示,三种标记物的复合图像则如彩图 3I 显示,注意颜色变化的情况。

(18) 使用 photoshop 软件可建立不同的图像组合,并很容易对不同抗体信号的重叠进行分析 (彩图 3G, H),也可将这些信息合并为一幅图像,节省杂志出版版面 (彩图 3I)。当然,重叠后颜色可用 photoshop 软件进行选择,要与标记物的颜色相符。用 Bio-Rad 公司的 Lasersharp 软件进行分析,可直接以真彩方式显示,并可同时存储三种单色标记图像和复合图像。

第十八章 果蝇荧光原位杂交单标和双标方法

用 degoxigenin (地高辛精) 标记探针和碱性磷酸酶显色在果蝇整装片进行原位杂交方法已经成为一种常规的方法。由于该方法需要碱性磷酸酶交联的第二抗体, 并需要酶作用底物, 因此, 该方法的应用有一定的局限。碱性磷酸酶底物的应用及其产物的扩散性使分辨率受到限制, 尤其在厚组织或胚胎的深部更明显。进行双标记和对实验结果解释也较为困难。

本章主要描述果蝇组织的荧光原位杂交技术 (fluorescence in situ hybridization, FISH)。与碱性磷酸酶反应产物不同, 荧光信号具有不扩散性, 因此可提高显微镜的分辨率。当与激光扫描共聚焦显微镜结合应用时, 其探针检测的分辨率和敏感性都得到增强, 另外还有突出的优点是可进行图像的三维重建, 并可对标本的深部进行观察。假如进行一种以上的探针标记, 可在复合图像上更好地评价两者重叠的程度和方式。除分辨率增加外, 重叠的部分还可通过产生新的颜色而非常易于观察, 如红色和绿色重叠产生黄色。用激光扫描共聚焦显微镜观察, 在亚细胞水平还可确定转录产物是否共存。

本章叙述如何产生双标记原位杂交的探针, 也描述了多种同时检测转录产物和蛋白质的方法, 以及这些检测技术在全胚和分割组织的应用。这些检测方法的基础是应用非放射性的 RNA 探针和荧光素标记的第二抗体。探针用地高辛精或荧光黄标记都可获得良好结果。抗这些分子的第一抗体和进行 RNA 探针标记的试剂和试剂盒可由 Boehringer Mannheim 购得。用来与第一抗体结合的是花青荧光团标记的无交叉反应的第二抗体。

与标准的碱性磷酸酶显色系统相比, 这一操作过程产生的信号强度与用于检测的设备有关。应用同样的 RNA 探针, 在 Zeiss Axioplan 2E 显微镜下检测, 荧光标记的结果与碱性磷酸酶检测系统相似。但用 LSCM 检测时, FISH 有更强的敏感性和更高的分辨率。

一、材料

1. 材料

- (1) RNA 探针的制备。
- (2) 高压灭菌的 1.5 ml 离心管。
- (3) 无 RNA 酶 EEPC (焦碳酸二乙酯) 处理水或双蒸水。
- (4) 5× T7/T3 转录优化缓冲液 (Promega, Madison WI, USA, 商品目录号 No.P1181)。
- (5) T7/T3 RNA 多聚酶 (Promega, Madison WI, USA, 商品目录号 No.2075, P2083; 1000U)。
- (6) 荧光黄 RNA 标记混合液 (Boehringer Madison, 商品目录号 No.1685619)。
- (7) 地高辛精 RNA 标记混合液 (Boehringer Madison, 商品目录号 No.1277073)。
- (8) RNA 防护剂 (RNA guard) (Pharmacia, 商品目录号 No.27-0815-01)。
- (9) 0.5 mol/L EDTA。
- (10) 4 mol/L 氯化锂。
- (11) 纯乙醇。
- (12) 70%冷乙醇洗涤液。

2. 胚胎的初步固定

- (1) 氯漂白剂: 用水 1:1 稀释。

- (2) 40%甲醛溶液 (用多聚甲醛新鲜配制)。
- (3) 10×PBS 溶液。
- (4) 庚烷。
- (5) 甲醇。
- (6) 20 ml 可任意处理的玻璃闪烁瓶 (Fisher)。
- (7) 高压灭菌的 1.5 ml 离心管。

3. 后固定和全胚切片的原位杂交

- (1) PBT 溶液: 1×PBS+ 0.1% Tween 20。
- (2) 当天制备的 40%甲醛溶液。
- (3) 20 mg/ml 蛋白酶 K (Sigma), 溶解于无菌的双蒸水, 50 μ l 等分后储存于-20℃。
- (4) 2 mg/ml 用 PBS 配制的甘氨酸。
- (5) RNA 杂交液: 50%甲酰胺, 5×SSC, 100 μ g/ml 肝素, 100 μ g/ml 鲑精 DNA, 0.1% Tween 20。经 20 μ m 滤膜过滤后等份分装后储存于-20℃ (至少在 6~12 个月内保持稳定)。
- (6) 180℃水浴。
- (7) 156℃水浴。

4. 杂交后洗涤和 FISH 信号的显示

- (1) RNA 杂交缓冲液
- (2) PBT 溶液: 1×PBS+ 0.1% Tween 20。
- (3) PBTB 溶液: 1×PBS+ 0.1% Tween 20+ 0.5%的奶粉。
- (4) 小鼠抗荧光黄单克隆抗体 (IgG, 0.1 mg/ml 储存液进行 1:2 000 稀释, Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada, 商品目录号 No.1426320)。
- (5) 绵羊抗地高辛精抗体 (IgG, 0.2 mg/ml 储存液进行 1:1 000 稀释, Boehringer Mannheim, Laval, QC, Canada, 商品目录号 No.1333089)。
- (6) Cy2 标记的山羊抗小鼠 IgG [IgG (H+L) F(ab')₂ 片段, 1 mg/ml 储存液进行 1:2 000 稀释, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA, 商品目录号 No.115-226-062]。
- (7) Cy3 标记的猴抗绵羊 IgG [IgG (H+L) F(ab')₂ 片段, 1 mg/ml 储存液进行 1:2 000 稀释, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA, 商品目录号 No.713-166-147]。
- (8) 胚胎封片液: 70%甘油, 2%DABCO (Sigma, St. Louis, MO, USA, 商品目录号 No. D-2522)。
- (9) 载玻片。
- (10) 盖玻片 (22 mm×50 mm)。
- (11) 荧光显微镜或 Bio-Rad MRC 1024 LSCM。

二、方法

1. RNA 探针的制备

(1) 进行转录前, 质粒模板应用适当的限制性酶切割, 使其完全线性化, 而后将苯酚仔细去除后, 进行氯仿抽提。将所有氯仿去除 (在 65℃加热 15 min 有助于去除氯仿), 加入 pH 7.2 醋酸钠至 0.3 mol/L, 3 倍体积的乙醇, 并冷却至-70℃ 20 min 使 DNA 沉淀。在低温离心机离心 10 min, 用 70%冷乙醇洗涤。一般制备 5~10 μ g 线性化的模板, 重新悬浮于 20 μ l 无 RNA 酶的水中。注意 DNA 模板应选择编码转录产物的独特区域。一般选择 0.4~1.0 kb 的核苷酸序列作为探针杂交效果较好。切割完全通常需 2~4h, 而

且应通过琼脂糖凝胶电泳加以确定。

(2) RNA 探针的制备可按 Boehringer Mannheim 提供的操作说明和步骤进行。在冰上加入 1 μg 线性化的模板 DNA (3~5kb), 2 μl 荧光黄或地高辛精, RNA 标记混合液, 4 μl 5 \times 转录缓冲液 [提供给 RNA 多聚酶使用: 0.4 mol/L pH 8.0 Tris-HCl, 60 mmol/L MgCl_2 , 100 mmol/L 二硫苏糖醇 (dithiothreitol, DTT), 20 mmol/L 精脒], 1 μl RNA 酶抑制剂 (1 U/ml), 加入无菌、无 RNA 酶的水使反应液最终体积达到 18 μl 。加入 2 μl 合适的 RNA 多聚酶 (T3 或 T7), 充分混合后 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。

(3) 转录反应完成后, 加入 1 μl 0.5 mol/L EDTA、2.5 μl 4 mol/L 的 LiCl 和 75 μl 纯乙醇使标记探针沉淀。转录反应完成后, 不需要用 DNA 酶去除模板。用 LiCl 沉淀探针可去除大部分未掺入的核苷酸, 冷却至 -70 $^{\circ}\text{C}$, 在低温离心机离心 10 min, 用 70% 冷乙醇洗涤。干燥后, 将沉淀物重新悬浮于 100 μl 无 RNA 酶的水中。以前用碳酸盐降解可缩短 RNA 探针的长度, 此步骤事实上常常是有害的。将探针 4~5 μl 加入普通的琼脂糖凝胶 (浓度约 1%) 进行电泳鉴定。通过溴化乙啶 (EB) 染色很容易对转录产物进行检测。探针储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$, 在冰上的几次冻融对探针活性影响不大。

2. 胚胎的初步固定

(1) 在胚胎脱绒毛前制备 40% 甲醛储存液。将 0.92g 多聚甲醛溶解于 2.5 ml 含 1 mol/L NaOH 35 μl 的水中。将混合液加热至 80 $^{\circ}\text{C}$, 直到溶解。商品甲醛, 即使是超纯甲醛, 也常常造成胚胎的破裂, 因此最好应用自己新鲜配制的甲醛。

(2) 收集并在水中洗涤胚胎。

(3) 收集的胚胎在氯漂白剂和水 1:1 混合液中脱绒毛 90s。当绒毛去除后, 胚胎则漂浮于混合液表面或粘着在收集筐的一边。胚胎应立即洗涤, 因为过度的脱绒毛是明显有害的。用大量水冲洗收集筐, 快速的流水冲洗有助于部分脱绒毛的胚胎脱绒毛。7 g/L NaCl、0.3 g/L Triton X-100 溶液有助于去除残留的漂白剂。

(4) 将胚胎移入 20 ml 玻璃闪烁瓶, 瓶内含有 8 ml 庚烷, 2.5 ml 1 \times PBS 和 250 μl 400 ml/L 甲醛, 振荡 20 min。此处使用的玻璃瓶的大小对于收集少量的胚胎 (250 μl 以下) 是较为理想的。但收集大量胚胎时, 应使用更大的玻璃瓶, 可按以上比例进行增大。50 ml 的 Falcon 试管用于固定和灭活 0.25~2 ml 的胚胎比较合适。应注意某些试管和塑料管可干扰胚胎的固定和灭活。

(5) 用 1 ml 移液管吸起胚胎 (位于混合液的 2 层之间), 注意水溶液影响随后灭活步骤的效力。此时灭活溶液浑浊, 只有 80% 以下的胚胎移去。将胚胎用吸管尖端吸出固定液时, 应注意不要吸取下层的水。将胚胎移入含有 0.5 ml 庚烷和 0.5 ml 甲醇的 1.5 ml 离心管使胚胎失活, 用力振荡使大部分胚胎沉入管底 (约 30 s)。仔细去除大约 75% 的庚烷和甲醇, 加入 1 ml 甲醇, 再振荡一次。此时, 大多数或全部胚胎都应沉入管底, 将所有液体连同胚胎一起移去, 用甲醇洗涤 2~3 次。如在转移胚胎的过程中有水溶液带入, 必须重复进行灭活步骤, 尽可能将庚烷和甲醛除尽, 并用新鲜庚烷和甲醇替换后, 再振荡 1 次。胚胎储存在甲醇中, 可在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存数月。

3. 后固定和全胚切片的原位杂交

下列步骤对沉淀于 1.5 ml 离心管中的大约 50 μl 胚胎是理想的。

(1) 胚胎在甲醇中洗涤 1 次。

(2) 用 PBT 洗涤胚胎 2 次。

(3) 0.5 ml PBT 溶液中含有 50 μl 新鲜配制的 400 ml/L 甲醛, 胚胎在该溶液中后固定 20 min, 将试管放在震荡平板上以保证固定均匀。

(4) 胚胎用 PBT 洗 3 次, 每次洗涤时间约 2 min。

(5) 加入含有 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 未消化的蛋白酶 K 的 PBT 溶液约 0.5 ml, 孵育 1~1.5 min。用吸管吸取液体并将胚胎轻轻吹入液体中。重复一次, 待胚胎沉下后将液体移去, 应至少保持 30 s。蛋白酶 K 的消化程度非常重要, 蛋白酶 K 的消化通常可增加探针的穿透性, 并使染色信号增强。然而, 过度的消化可造成

胚胎形态结构不佳,并引起胚胎断裂。进行蛋白质(抗体)的双标记时,蛋白酶K的消化也会破坏蛋白的抗原性。通过降低蛋白酶K的工作浓度有一定的补偿作用。实际上,在进行原位杂交时,有时不用或少用蛋白酶K消化同样可获得良好的结果。新配制的蛋白酶K储存液应经过几种不同稀释浓度和几次消化实验的测试。将蛋白酶K溶解于灭菌水中制备储存液,20~50 μl 等份分装后,储存于 -20°C 。反复的冻融似乎可使蛋白酶K的活性增加。

(6) 加入1 ml 含有2 mg/ml 甘氨酸的PBT终止蛋白酶K消化。洗涤2 min后将液体吸去,并再加入同样液体,洗涤2 min。

(7) 用PBT洗涤胚胎2次以去除甘氨酸。

(8) 用含有4%甲醛的PBT将胚胎再次后固定20 min,将试管放在震荡平板上以保证固定均匀。

(9) 将胚胎充分冲洗,以去除所有残留的固定液。

(10) 用1 ml 500 ml/L的PBT、500 ml/L RNA杂交液洗涤胚胎,用1 000 ml/L杂交液替换以上混合液后,胚胎在 56°C 至少预杂交2 h。如果需要,胚胎可在杂交溶液中 -20°C 储存过夜。杂交溶液应在加热步骤前2 h配制。

(11) 预杂交后,胚胎放置在0.5 ml 无菌离心管中,将预杂交液移去后,加入探针。最佳的探针浓度应通过实验确定,一般在100 μl RNA杂交液中含有1 μl 探针就可获得满意结果。稀释后的探针加热至 80°C ,3 min,在冰上冷却后加入胚胎。

(12) 56°C 杂交12~16 h。在此过程中,可通过颠倒离心管或用吸管轻轻吹打使胚胎混合2~3次。

4. 杂交后洗涤和FISH信号的显示

(1) 将离心管以1 500 rpm离心约10s,移去杂交液和胚胎。

(2) 吸去探针溶液,用400 μl 预温的杂交缓冲液洗涤胚胎1次。再用400 μl 预温的杂交缓冲液重复洗涤胚胎1次,并在 56°C 保持20~30 min。在洗涤过程中,颠倒离心管几次。

(3) 用1:1的PBT和杂交缓冲液混合液洗涤胚胎20~30 min,而后用PBT洗涤4次,每次5 min。所有洗涤溶液应预温至 56°C 。

(4) 冷却至室温,用400 μl PBTB (1 \times PBS、0.1% Tween 20、0.5%奶粉) 孵育10 min,在此步骤和以后的步骤使用奶粉可降低背景。

(5) 第一抗体用PBTB稀释到合适浓度,而后用第一抗体孵育胚胎,检测杂交的RNA探针。对于双标记,应加入荧光黄和地高辛标记的抗体。这里使用的抗体多是冻干品,为保证结果的一致性或便于使用,可将粉末用500 ml/L甘油悬浮,等份分装后储存于 -70°C 。一部分可保存在 -20°C ,不仅便于使用,也非常稳定。用第一抗体孵育2 h(也可在 4°C 孵育过夜),最好在振荡器中不断振动混合。

(6) 用PBTB液洗涤4~5次,每次更换新液。洗涤时间为1~2 h或过夜。

(7) 加入适量的用PBTB稀释的第二抗体,在不断震荡中孵育2 h。此步骤和以后的步骤应在暗光下进行,可用锡箔将离心管包裹上。应记住此处选择的抗体在双标记中是有用的。第一抗体是由不同种属动物制备的全IgG片段,相似地,选择的第二抗体不能与第一抗体或其他的第二抗体有交叉反应。Jackson Laboratories可提供许多不同种类的抗体,并提供抗体的资料和选择的建议,使得抗体的选择和得到合适的抗体较为容易。许多适用于多标记的抗体标记为“ML”,这些抗体通常是由IgG的F(ab')₂片段组成,可识别目标抗体的重链和轻链(H链和L链)。ML也经多种动物血清的预吸收。选用花青交联的第二抗体是因为它们的发射光谱较强,而且有抗光漂白作用,后者对于使用高能激光的LSCM尤其重要。

(8) 用PBTB液洗涤4~5次,洗涤2 h,最后再用PBT洗涤。

(9) 将胚胎悬浮于含有DABCO的封片液中,在重新悬浮和封片前让胚胎沉到离心管底部(需要1~3 h或 4°C 过夜)。

(10) 将胚胎移至含有约80 μl 封片液的干净载玻片上,用20 mm \times 50 mm盖玻片封片,盖玻片边缘

用指甲油密封。玻片可在或 4℃ 暗处保存数周。在最初几天，常可降低背景染色。

(11) 胚胎可用普通荧光显微镜和 LSCM 观察。LSCM 的基本技术在本书其他章节讨论。彩图 4 显示了果蝇胚胎的 FISH 双标记结果。

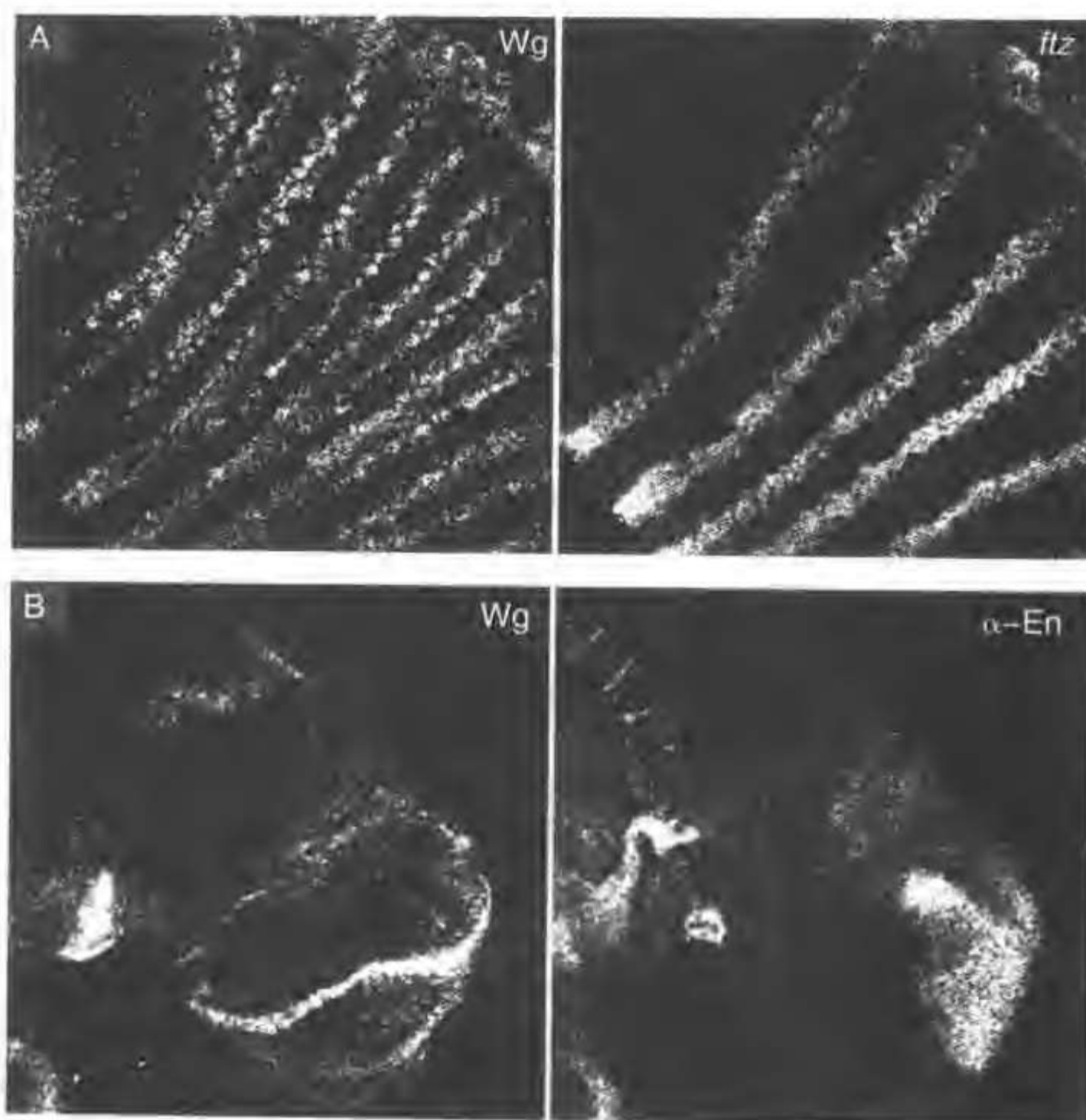


图 18-1 A: 显示细胞性胚盘胚胎的躯干区, 左侧用 wg 转录物 (transcripts) 检测 (CY3 通道), 右侧用 ftz 转录物检测 (CY2 通道); B: 左侧显示 wg 转录物检测的翼成虫板 (wing imaginal disc) (CY2 通道), 锯齿状蛋白 (engrailed protein) 显示在右侧 (CY2 通道)

5. RNA-蛋白质双标记

(1) 除蛋白酶 K 步骤以外, 胚胎收集和固定的方法如前所述。蛋白酶 K 的浓度应低到足以保存蛋白质抗原的完整性。

(2) 在杂交和洗涤步骤后 (方法同前), 加入特定蛋白的第一抗体, 再加入抗荧光黄或抗地高辛精的抗体。为保证信号不发生交叉反应, 检测蛋白质特异性的抗体和探针特异性的抗体必须来源于不同的动物。

(3) 第一抗体孵育和洗涤后, 应用合适的第二抗体进行检测。洗涤和封片与单标或多标 FISH 相同。如仔细选择抗体, 可实现转录产物和蛋白质的三重标记。而且, 第二抗体应用 Cy5 标记的抗体, 这样才能在 LSCM 下观察到检测产物。

(4) 在分割的组织进行 FISH:

①分割的组织如成虫板保存在 PBS 中的涎腺，可将含有 PBS 的离心管保持在冰中用于收集足够分析用的组织，最好在 30 min 内完成。

②将 PBS 移去，加入 50 μ l 10 \times PBS、325 μ l 水、500 μ l 庚烷和 125 μ l 40%甲醛（临用前新鲜配制，方法同上）。轻轻振摇 45 s。

③移去庚烷和大部分固定液，用含 4%甲醛的 PBT 替换，轻轻振荡混合中再固定 20 min。

④用 PBT 洗涤 4 次，进行蛋白酶 K 和以下步骤，方法与胚胎标本相同。使用合适的试剂进行 FISH 单标或双标，也可进行 FISH/蛋白双标记。彩图 4 显示了在分割的成虫板进行 FISH/抗体双标记的结果。

第十九章 用荧光标记的蛋白进行活体共聚焦分析

激光共聚焦显微镜分析技术、试剂以及蛋白荧光标记技术的发展为观察细胞内结构和成分奠定了坚实基础。当我们能够在共聚焦显微镜下观察荧光标记的蛋白质时,研究和分析活细胞中特定蛋白质的动力学即成为现实。活体分析能够很好地观察和研究细胞动力学及其发展变化的特性。而这些活的特性是根本不可能在固定标本中所能观察和分析到的。另外,只有活体荧光标记分析技术才能细致研究突变和药物诱导表型的方方面面。再者,活体分析不仅已经揭示了胚胎中存在的结构,而且澄清了许多既往基于固定标本研究的模糊认识。

虽然活体荧光标记分析技术的问世才短短的几年,但发展迅速,这在很大程度上受益于绿荧光蛋白(GFP)的广泛使用。另外经济便捷、品质优越的荧光试剂和高级荧光显微镜,如共聚焦显微镜的研制和开发,亦为活体荧光标记分析技术的发展提供了物质基础。通过导入荧光素直接标记纯化的蛋白质,可以观察和分析活胚中蛋白质动力学变化。对于无 GFP 融合表达的蛋白质(如胚胎形成早期)或当融入 GFP 将破坏原有蛋白质结构和功能时,上述直接荧光标记技术为研究特定蛋白质提供了最佳途径。另外,直接荧光标记技术还为同时检测多荧光探针奠定了基础。

实验中发现制备出荧光标记的蛋白质将其“无创”地导入细胞内是一个极其重要的技术环节。因此,本章节详细介绍一种适用于活体分析的直接荧光探针标记抗体技术以及此技术在纯化的细菌过表达蛋白质研究中的应用。接着我们以果蝇胚胎为例,介绍荧光标记蛋白微注射技术的要点。最后,介绍上述技术在果蝇及其生物体研究中的成功应用。

蛋白质可以通过几种类型的化学反应达到共价修饰。常用的荧光素衍生物可以修饰氨基酸或巯基;琥珀酰亚胺基酯和异硫氰酸盐是最常用的荧光素衍生物,常被用来标记蛋白质的胺(赖氨酸残基和 N-末端氨基组)。琥珀酰亚胺基酯以其反应更具特异性、快捷性、耐酸和产物稳定性而较异硫氰酸盐应用更为广泛。磺酰氯化物,如 lissamine 罗丹明 B 磺酰氯化物得克萨斯红(Texas red)磺酰氯化物具有较强的反应活性和水不稳定性,特别是在 PH 值高的环境中(如与脂肪族氨基酸反应时),从而使得交联很困难。琥珀酰亚胺基酯衍生物交联技术有了较大发展。半胱氨酸残基的巯基团可被碘乙酸衍生物标记,因为半胱氨酸含量稀少,所以标记半胱氨酸更具特异性。另外,半胱氨酸可以插入蛋白质以利于标记。

然而,因为半胱氨酸含量稀少而且对蛋白质功能有影响,所以用琥珀酰亚胺基酯随机标记半胱氨酸更为可行。虽然得到最佳的交联效果需要大量实验探索,但是一般正确的蛋白荧光标记足以达到活体组织观察的要求。以下将介绍两种抗体标记技术以及琥珀酰亚胺基酯作为荧光标记物分析融合蛋白质的表达。

一、材料

(1) 0.1 mol/L Na_2CO_3 (pH9.3)。

(2) 2 mol/L 谷氨酸钾盐 (pH8.0)。

(3) 小旋转柱内有 850~1 000 μl 脱盐胶(如 Bio-Gel P-6),小旋转柱是包装好的商品(Bio-Rad, 产品编号: 732-6002),并按说明使用。除此之外,还可以买小的可重复使用的 Bio-Spin 塑料柱(Bio-Rad, Cat no.732-6008)及树脂(Bio-Rad, Cat no.150-0738),并将其组装使用。16g 高温处理过的 Bio-Gel P-6 干燥树脂溶于 200 ml 蒸馏水以制得脱盐胶的储存品,并于室温下长期保存。取 1 600~2 000 μl

高温处理过的胶 (含树脂 850~1 100 μl) 灌入小离心柱。柱子放入 13 mm×100 mm 的玻璃试管内。从树脂上端加入 1.5 ml 工作缓冲液 2 次, 缓冲液依靠重力过柱以达到平衡柱的目的。将柱放入一个 17 mm×100 mm 塑料带盖的试管 (盖子已去掉), 管内含有一个 1.5 ml 微量离心管。在临床离心机上从最大速度离心以除去多余的缓冲液。在树脂上加样及离心 (方法同上述), 用一个新的 1.5 ml 微量离心管收集过柱的蛋白液。

(4) 25 mmol/L 荧光物储存液 (溶于二甲亚砜, DMSO), -80°C 长期保存。DMSO 要求品质高、干燥。用适宜的消光系数吸收测定荧光物的浓度。

(5) SM-Z 聚苯乙烯珠 (Bio-Rad; 编号 150-3920), 蛋白缓冲液平衡前先用甲醇预洗。

(6) 任意 IgG 用于预反应, IgG 可购自 Jackson Immuno Research 或 Sigma 等多家公司。

(7) 注入缓冲液: 50 mmol/L 谷氨酸甲 (pH7.0), 0.5 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L 谷胱甘肽。

二、方法

(一) 荧光标记抗体的制备需要的条件

本节详述琥珀酰亚胺基标记蛋白质。目前常用的几种荧光素, 其激发/发射最大值非常接近氩/氩激发发射波 (488 nm、568 nm、47 nm)。共聚焦显微镜配有光学滤镜, 几种常用的荧光素及其特性见表 19-1。

表 19-1 适用于氩/氩激光器的几种荧光素 (激光波长 488、568 和 647 nm)

荧光素	激光波长 (nm)	发射波长 (nm)	消光系数 ($\text{Mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)	E_{488}/E_{DM}
Fluorescein (荧光黄)	495	519	74 000	0.19
Oregon green 488 (俄勒冈绿 488)	550	570	76 000	0.19
Cy3	550	570	150 000	0.08
Tetramethylrhodamine (四甲基罗丹明)	546	576	95 000	0.21
Rhodamine red-X (罗丹明红-X)	560	580	129 000	0.17
X-Rhodamine (X-罗丹明)	574	602	78 000	0.20
Texas Red-X (得克萨斯红-X)	583	603	116 000	0.15
Cy5	649	670	250 000	0.05

以上参数来自 Molecular Probes 和 Amersham。

荧光值和荧光的吸收有赖于 pH 值条件, 详见 Molecular Probes 目录。此表中所列值的条件是 pH9.0, 当 pH<7.0 时吸收和发射明显降低。表中所列值是在 MeOH 中测定的。pH8.0 缓冲液中吸收和发射谱线均向红谱位移动约 8 nm, 并且消退系数降低 10%。

俄勒冈绿 488 是一种新的荧光素, 具有与荧光黄 (fluorescein) 相同的吸收和发射谱。但是俄勒冈绿 488 具有较强的稳定性, 不易发生荧光漂白且对 pH 条件要求更低。其他荧光素, 如 Molecular Probes 系列 BODIPY 荧光素, 当交联于蛋白质时易发生猝灭。这些荧光素带有空间臂利于标记蛋白质。俄勒冈绿, Cy3 和 Cy5 尤适用于单标记。四甲基罗丹明以其价优而常代替 Cy3 使用。在双标方法中我们提倡俄勒冈绿+得克萨斯红/X-罗丹明/Cy5。Cy5 和荧光质的发射谱易于区分, 但因为 Cy5 荧光不宜用肉眼观

察, 所以常为得克萨斯红和 X-罗丹明所代替使用。四甲基罗丹明或 Cy3 也可与荧光质或俄勒冈绿用于双标记, 但其发射谱线常相互重叠, 会影响信号的识别。虽然得克萨斯红-X 和 X-罗丹明具有良好的谱线, 但是由于其疏水性而不利抗体的荧光标记。当化学计量值 <1.2 (染料/抗体) 时, 用得克萨斯红-X 标记将优于用 X-罗丹明标记。

所需缓冲液和材料见后。因为不同批间的荧光素反应不同 (储存也会降低反应性), 所以用任意 IgG 预试验来探索适宜的反应条件是必需的。以下操作规程使用于室温下小范围的标记反应 ($100\ \mu\text{l}$, 抗体浓度 $0.5\sim 20\ \text{mg/ml}$), 并可根据需要按比例增加。为了探索标记反应的适宜荧光素浓度, 按标记抗体的浓度选用随机 IgG 进行三个反应实验。反应中分别加入 $25\ \text{mmol/L}$ 、 $8\ \text{mmol/L}$ 或 $3\ \text{mmol/L}$ 荧光素各 $1\ \mu\text{l}$ 。结果认为 $1:4$ (荧光素分子数: 蛋白质分子数) 条件下的浓度为适宜浓度。如果三个反应实验未得出理想的化学计量值, 还需再进行反应实验来摸索。

(1) 耦联缓冲液 ($0.1\ \text{mol/L}\ \text{Na}_2\text{CO}_3$ pH9.3) 中平衡一个离心脱盐柱。 $100\ \mu\text{l}$ 抗体溶液 (浓度在 $0.5\sim 20\ \text{mg/ml}$ 之间) 加入柱子, 旋转以洗脱柱体至一微离心管中。此步骤保证抗体在耦联缓冲液中能得到较好的复性。

(2) 抗体溶液中加入 $1\ \mu\text{l}$ 荧光素的 DMSO 溶液, 轻弹试管以混匀 (不要产生泡沫)。

(3) 室温下孵育 $30\ \text{min}$ 。

(4) 加入 $2\ \text{mol/L}$ 谷氨酸甲 (pH8.0) $10\ \mu\text{l}$, 谷氨酸盐的自由胺将终止反应。

(5) 抗体加入第二个离心柱。如果抗体用于活体分析或 PBS (抗体将用于固定标本的免疫荧光检测) 时, 离心柱应先用缓冲液平衡。此步骤将分离已标记的抗体与游离荧光素, 并将抗体交换至适宜注射和储存的缓冲系中。如果游离荧光素未被完全脱去, 则抗体应与等体积的 SM-2 聚苯乙烯珠 (预先经 MeOH 洗涤和注射缓冲液平衡) 在 4°C 下孵育 $1\ \text{h}$ 。标记的抗体可用于检测游离荧光素: 滴加 SDS 至 0.5% , 5 体积的冷乙醇加入蛋白质, 并分析上清液中荧光素。

(6) 取 $10\ \mu\text{l}$ 含荧光标记抗体的溶液并避光储存在 -4°C 。将剩余溶液按 $2\ \mu\text{l}$ 分装并存于 -80°C 液氮中, 用于活体组织分析。如用于固定标本的免疫荧光染色, 则按 $10\ \mu\text{l}$ 分装并迅速低温冻存。

(7) 用注射缓冲液稀释 $10\ \mu\text{l}$ 含荧光标记抗体的溶液, 并定容到 $100\sim 150\ \mu\text{l}$, 测样品的吸收谱线。图 19-1 是蛋白质在两种化学计量下的吸收谱线, 通过计算荧光素分子溶度与蛋白质分子浓度之比得出标记时的化学剂量值。虽然最佳的化学计量值有赖于荧光素准确应用, 但是我们发现对于果蝇胚的活体分析或固定样本的免疫荧光染色过程, 荧光素标记抗体的化学计量值介于 $1\sim 4$ 时, 足以产生令人满意的结果。如果化学计量值过高或过低, 应在步骤 (2) 中采用相应浓度的荧光素。

(二) 荧光标记抗体制备过程

荧光标记与纯化的蛋白所需的条件与标记抗体的条件相似。因为不同蛋白质特性不同, 所以荧光标记的技术步骤也会有所不同, 关键都是要求不干扰该蛋白质的功能和活性。鉴于多种蛋白质的稳定性逊于抗体, 因此实验条件较抗体标记应柔和。

(1) 蛋白质置于 $50\ \text{nmol/L}\ \text{Na}_3\text{PO}_4$ (pH8.0)、 $250\ \text{mmol/L}\ \text{NaCl}$ 、 $1\ \text{mmol/L}\ 2\text{-巯基乙醇}$ 。融合蛋白纯化的最后一步是 Superose-6 凝胶过滤色谱分析 (Pharmacia), 不仅有利于与缓冲系交换蛋白质, 去除聚集的蛋白质及蛋白质降解物, 而且利于对纯化蛋白的准确定位。其他缓冲液及盐的浓度, 可用于标记反应, 但不应含有初级胺 (如 Tris) 或强还原剂 (如 DTT)。当缓冲液 pH <8.0 时, 标记反应的速度明显变缓, 甚至有出现荧光素与半胱氨酸巯基副反应的可能。

(2) $25\ \text{mmol/L}$ 荧光素的 DMSO 溶液 $0.75\ \mu\text{l}$ 加入 $75\ \mu\text{l}$ 融合蛋白液中 ($1\sim 5\ \text{mg/ml}$), 含有 $50\ \text{mmol/L}$ 磷酸盐 (pH8.0)、 $250\ \text{mmol/L}\ \text{NaCl}$ 、 $1\ \text{mol/L}\ 2\text{-巯基乙醇}$ 。正如抗体的荧光标记技术, 荧光素加入量据实际而定, 以期获得理想的标记化学计量值。

(3) 冰上孵育 $5\ \text{min}$ 。

(4) 加入 $7.5\ \mu\text{l}$ 谷氨酸钾 (pH8.0) 和 $0.75\ \mu\text{l}\ 0.5\ \text{mol/L}\ \text{DTT}$ 以终止反应。

(5) 将标记反应移入预先经 50 mmol/L HEPES 和 100 mmol/L NaCl (pH7.6) 平衡过的离心柱中, 以除去游离荧光素并将蛋白质转移至注射缓冲液中。如果游离荧光素未被完全脱去, 则抗体与等体积的 SM-2 聚苯乙烯珠共同孵育于 4℃ 下 1 h。按以上所述分离抗体与游离荧光素。

(6) 用光谱学检测标记的化学计量值 (图 19-1): 如果蛋白质荧光标记过强或不足, 可相应调节荧光物的量, 并按上述程序重新标记。荧光标记蛋白质的化学计量值约为 0.5 荧光素分子/蛋白质。标记蛋白质的化学计量值通常等于标记抗体的水平, 目的是为了维护蛋白质的功能。

(7) 按 2 μ l 体积分装已标记的蛋白质液, 置于 -80℃ 液氮中冻存。

(三) 标记的化学计量学运算

标记的化学计量学运算是计算荧光素与蛋白质分子之比, 比值反映出平均单个蛋白质分子交联荧光素分子数的多少。

样本中荧光素浓度 = 荧光素 (在特定波长下) 最大吸收率时的样本吸收率 / 该波长下荧光素的消光系数

$$[\text{荧光团}] = A_{DM} / \epsilon_{DM}$$

A_{DM} : 表示标记荧光素最大吸收时 (如荧光质在 495nm 波长时) 的样本吸收率。

ϵ_{DM} : 表示标记荧光素最大吸收时荧光素的消光系数 (如荧光质在 495 nm 波长时, 其消光系数为 74 000 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 见表 19-1)。

样本中蛋白质浓度按下式计算:

$$[\text{蛋白质}] = [A_{280} - A_{DM} \times (\epsilon_{DM280} / \epsilon_{DM})] / \epsilon_P$$

A_{280} : 样本在 280 nm 波长时的吸收率; A_{DM} : 标记荧光素最大吸收时样本的吸收率; ϵ_{DM280} : 280 nm 波长时荧光素的消光系数; ϵ_{DM} : 标记荧光素最大吸收时荧光素的消光系数; ϵ_P : 280 nm 波长时蛋白质的消光系数。

图 19-1 描述了罗丹明标记的某种蛋白质的吸收谱线, 虚线和实线分别表示化学计量值为 5 和 1 时的吸收情况, 虚线示当荧光素过量标记时, 谱线具有双峰特性。非共价二聚体结合于同一蛋白分子上引发荧光猝灭是出现 522 nm 吸收峰的原因。用罗丹明标记时, 即使是在化学计量值 < 1 也会出现上述情况, 因为罗丹明易于形成二聚体 (即使是在溶液中)。355 nm 波长吸收峰是罗丹明的另一个吸收峰。

在 280 nm 波长时蛋白质消光系数的计算: Gil 和 Hippel (Gil SC, Von Hippel PH. *Analyt Biochem*; 1989; 182: 319~326) 证实, 在大多数情况下, 天然蛋白质可据其氨基酸构成 (标准差为 $\pm 5\%$) 推算其消光系数: $\epsilon_{D280nm} = [(\text{色氨酸分子数}) \times 5690 + (\text{酪氨酸分子数}) \times 1280 + (\text{半胱氨酸分子数}) \times 120] \times 1.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

(四) 注射针的准备

(1) 注射针实际上是 75 mm 玻璃管, 包括内外径分别是 0.9 和 1.21 的尖 (Drummond Scientific, Broomall, PA cat NO.N-51A)。

(2) 有专门的玻管牵拉器以准确牵拉玻璃管制成注射针, 通常情况下, 一次牵拉出 3 或 4 个针并在高级显微镜下检查, 只有尖端光滑无破损的针才符合要求, 将其置于装有粘土的皮氏皿中于 4℃ 保存。

(3) 注射针与 10 μ l 汉密尔顿注射器 (4℃ 中已预冷) 配套使用。从 -80℃ 环境中

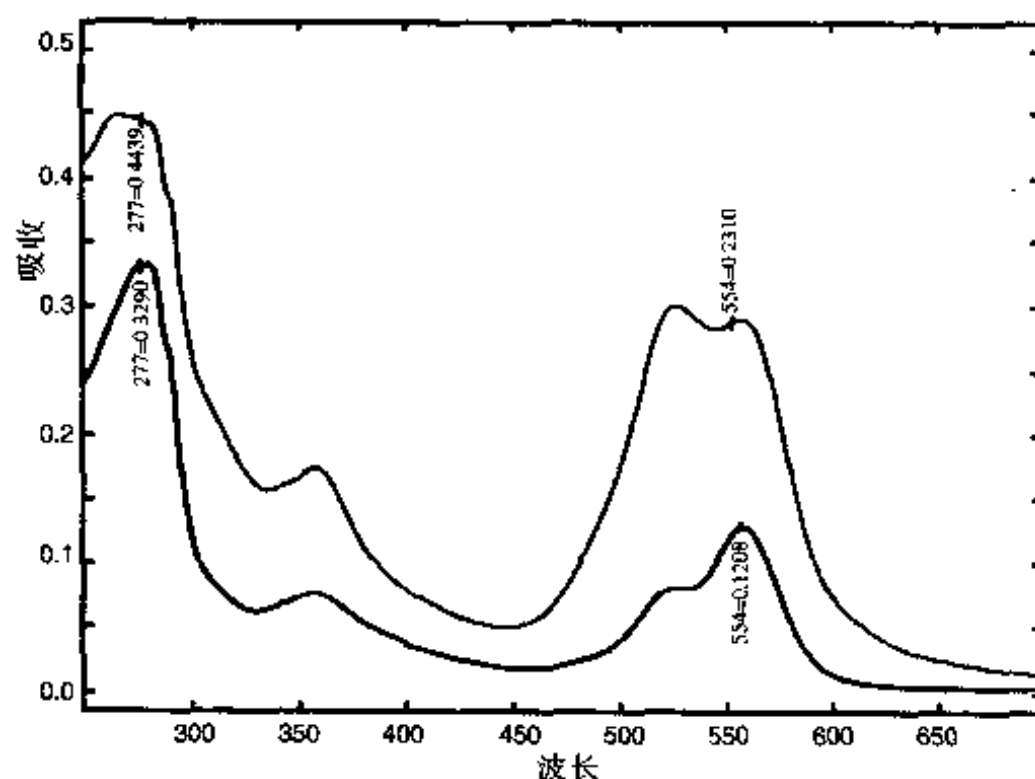


图 19-1 同一种蛋白质荧光标记物的吸收光谱。荧光团与蛋白质的摩尔比率分别为荧光团:蛋白质=1:1 (粗线) 和荧光团:蛋白质=5:1 (细线)

取 2 μl 荧光标记蛋白的储存液，迅速解冻并置于微量离心管中离心 3 min (10 000 rpm)，以分离并去除变性和凝集的蛋白质，用面阻塞针尖。用汉密尔顿注射器吸取离心管中的荧光标记蛋白液，注射针置于 4℃ 以下避光保存。

(4) 在注射针尖制出直径约 3~5 μm 的小孔 (因为合胞体胚核的直径为 5 μm)。方法如图 19-2 示，将注射针连于微量注射器后适当施压。图 19-2A, B 示：将注射针轻轻抵于覆有盐碳油 (halocarbon oil, Series 77, CAS no 9002-83-9, Halocarbon Products Corp.) 的玻片上。当注射针尖处于显微孔时，可以立即观察到注射器中液体流至油中，界限非常清晰。

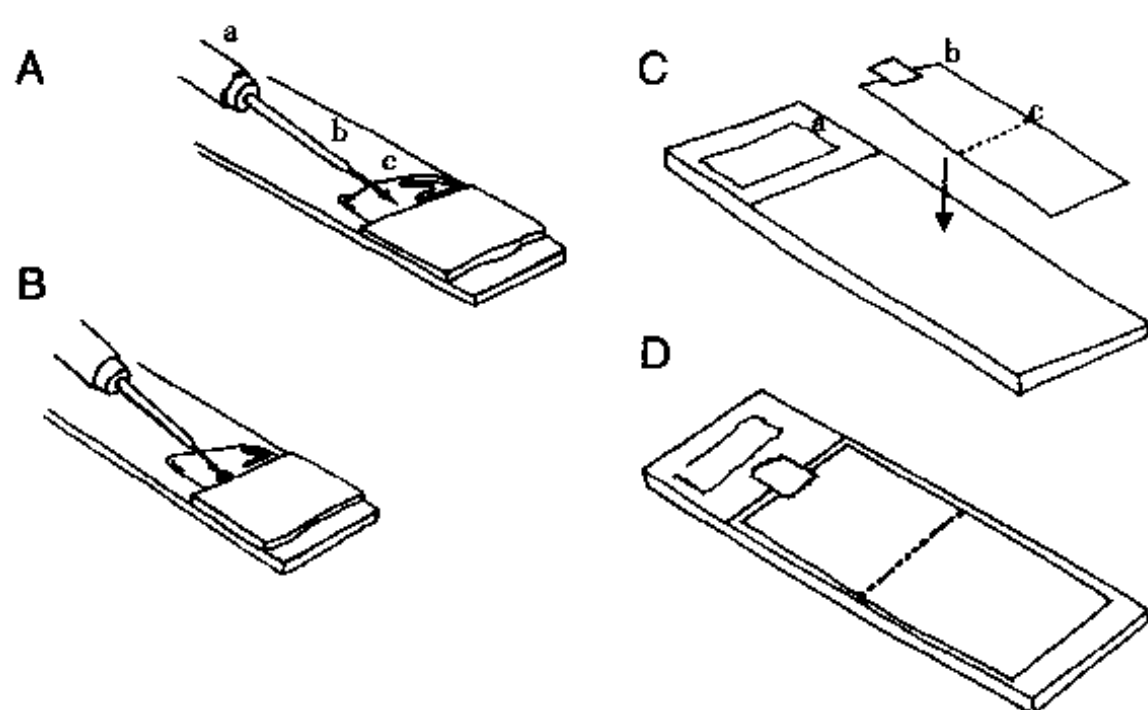


图 19-2 制备微注射针尖孔 (A, B) (a. 注射针手柄; b. 微量注射针; c. 盐碳油) 及微注射样本的制备 (C, D) (a. 双面胶; b. 盖玻片; c. 胶线)

(5) 将制备好的注射针从注射器上取下并置于 4℃ 以下避光保存。此法可以确保加样注射针足以用于一整天的微注射。

(五) 样本制备和加样

标记对蛋白质的破坏作用以及荧光激发的辐射毒作用是活体荧光标记蛋白检测面临的两大问题。对蛋白质功能的检测有助于了解荧光标记对特性蛋白质活性和生化特性的影响，但上述方法不能用于检测非特性蛋白质。因此我们认为标记的化学计量值 (荧光素/多肽) 是关键技术指标。在微注射前离心蛋白质以去除变性的蛋白质。目前已有许多方法用以得到活性蛋白质并将其注入胚中以检测标记蛋白质的活性。对于细胞骨架蛋白质 (如肌动蛋白和微管蛋白) 的检测，主要是在标记后通过多次组装和拆分得到活性蛋白质。DNA 结合蛋白质组蛋白和拓扑异构酶 II 标记的同时与 DNA 纤维素结合以保护重要的功能位点不被修饰。

蛋白质注射液的浓度是另一个技术要点，蛋白质注射液浓度 > 10 mg/ml 时有破坏效应。有丝分裂受阻和偏差现象常提示浓度不当或荧光辐射损害。这些现象在注射区尤为明显，因为此区域内蛋白质注射液浓度最高。为了减少荧光辐射损害，可以通过减少摄像的频率并增加中密度滤片以减少光束强度。最后，通过固定分析来调整记录结果，这是技术上的互补。虽然对单个固定样本无法动态观察和分析，但是大样本量观察和分析是可行的。一系列图像将有助于动态研究。固定样本分析和活体研究相结合的方法对于研究突变和药物诱导的异常表型是一种行之有效的办法。

活体荧光分析有助于观察和了解果蝇胚早期分化过程中突变因素或药物作用下的变化。下面举三例说明。

(1) 将罗丹明标记的微管蛋白注入果蝇胚中，每 10~30 s 用共聚焦图像观察 1 次，以研究皮质胚分裂时微管动力学变化 (图 19-3)。在核周期早期，新微管构成了 11 个明亮的星体结构，在胚核两端清晰可见，似黑环样表现 (A)；当核包被破裂后，微管蛋白进入核内 (B)；在分裂中期，由于配对中心体间微管密度和长度的增加，有荧光表达的有丝分裂纺锤体更易观察到 (C~E)；分裂后期由于染色体分离，纺锤体长度增加 (F)。当胚进入分裂末期时，由于姊妹核再度被核包被包绕，微管蛋白又被限制于核外。当核处于分裂期间时，由于中心体的移动或核的旋转，星状微管结构在焦平面内就不易观察到了 (19-3H)。

(2) 用罗丹明标记的组蛋白作为荧光探针 (图 19-4)，观察果蝇皮质核周期内染色体的变化。在核

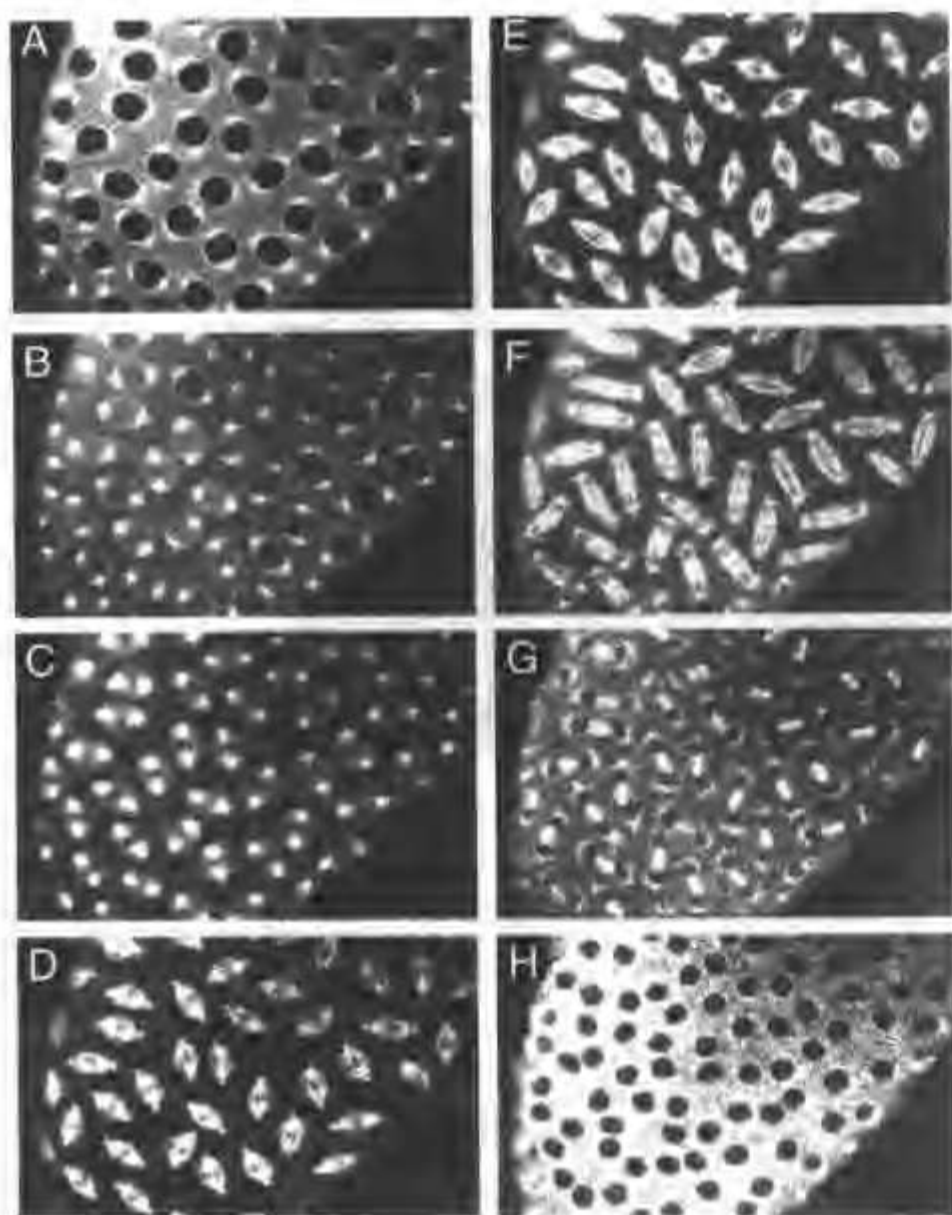


图 19-3 活体果蝇胚中微管蛋白的动力学分析 (引自 *Journal of Cell Biology*)

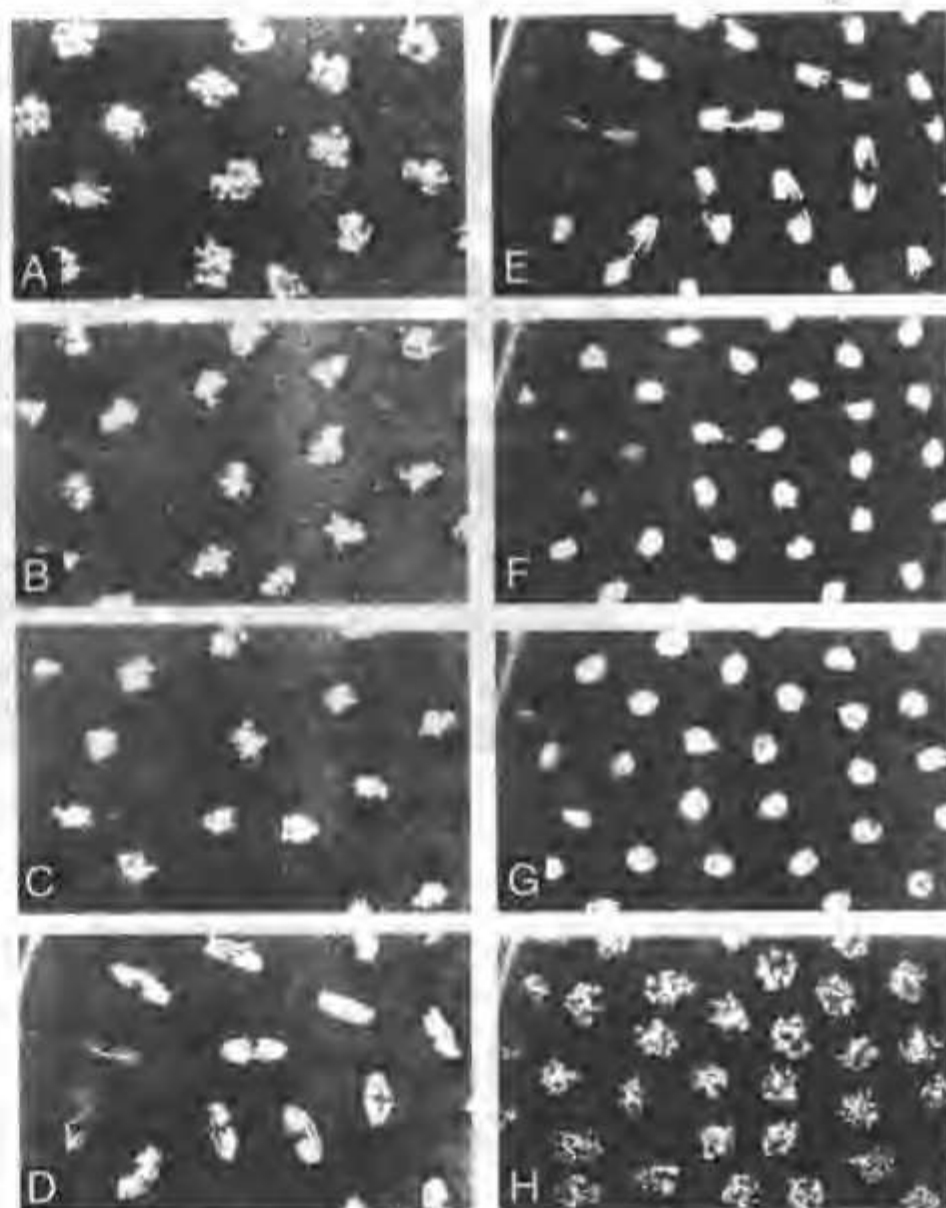


图 19-4 应用荧光标记的组蛋白观察活体果蝇胚中染色体行为分析 (引自 *Molecular Biology of the cell* 1993, 4: 885-896)

周期早期的末时相, DNA 聚焦 (A) 并且出现染色体沿中板排列 (B); 分裂中期染色体达到最大程度的聚集 (C), 为后期分裂作准备 (D); 后期的末时相, 姊妹染色体完全分离, 染色体臂清晰可见 (E)。在末期可见胶样散在分布的荧光标记的组蛋白, 提示 DNA 发生解聚 (F)。在染色体再度出现聚集以前, 也就是说和进入下一周期前 (包括短暂的分裂间期), DNA 处于解聚状态 (H)。

(3) CP190 是果蝇中心蛋白 (有 1096 个氨基酸组成)。CP190 以细胞周期特异性方式出现在间期的核中以及有丝分裂时的中心体。为了确定 CP190 上与核及中心体锚着的氨基酸片段, 设计了一系列 6×组氨酸融合蛋白, 在时间分辨荧光共聚焦显微镜下观察。注入荧光标记蛋白的结果见图 19-5。按一定时间间隔摄取胚表面某一部位的图像。融合蛋白 CP190a (含有 CP190 上 167~321 氨基酸片段) 定位于间期核和有丝分裂期的胞浆中 (图 19-5, 左边); 融合蛋白 CP190b (含有 CP190 上 266~608 氨基酸片段) 定位于细胞周期的中心体上 (图 19-5, 中间); 融合蛋白 CP190a+b (含有 CP190 上 167~608 氨基酸序列) 定位于间期核及有丝分裂时的中心体上 (图 19-5, CP190a+b, 右边)。据此分析得出, 一段有 19 个氨基酸序列负责核定位; 而一段含 124 个氨基酸 (位置靠近蛋白质中心) 的序列负责中心体上的定位。

三、注意事项

1. 样本应牢固附于盖片以利于加样注射和记录, 因此我们制备了精炼胶。将 5~10 ml 烯化合物及大于 12 英寸的双面胶加入 50 ml 锥形管中并旋转过夜。将上述溶液分装入 1.5 ml 离心管中离心以分离和去除杂质颗粒, 所得溶液微量抽吸。七烯化合物挥发后溶液将变得粘稠, 因此应适当加入七烯化合物以稀化溶液。

2. 为了利于注射胚组织, 载玻片的一端贴有双面胶, 另一端暂时贴上盖玻片。用细吸管吸取少量胶溶液在该玻片中部涂一 2 μ l 细胶线 (图 19-2C, D)。

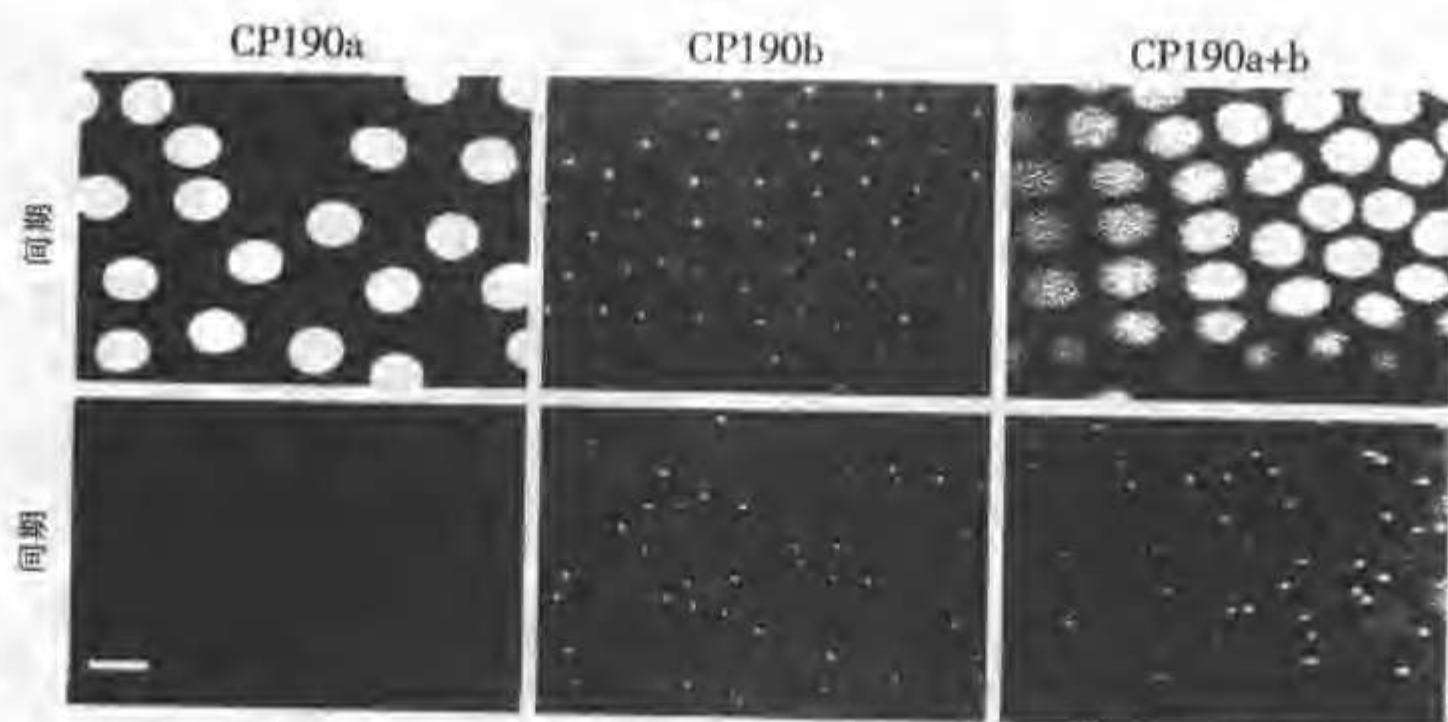


图 19-5 活体果蝇胚中心体蛋白 CP190 的结构域分析

3. 从收集皿中取 20~30 个 1~2 h 时龄的果蝇胚，置于双面胶上，胚已去绒毛膜。10~15 个胚沿胶线排列。

4. 为避免注射时胚出血，胚被置于一个干燥箱中 8~14 min [放在 Drierite (一种干燥剂) 的密封的塑料盘]。依据每天温度和湿度不同，干燥时间从 8~15 min 不等。但须注意胚干燥不可过度，以免影响结果，干燥过度可表现为胚上出现牵张的痕迹和压痕。

5. 胚干燥后，立即用油包被并开始微注射。手工微注射尤其要注意掌握好针的压力。正确的操作是：将注射针尖没于油面以下，在接近胚的位置适当加压并观察到油中出现注射液小泡。调整压力以得到平稳增大的注射液泡。从泡中移出注射针。如果压力正确则无液体从针尖流出。当针尖再次置于泡中则泡的体积会再度扩大。以此压力，胚可吸收足够的液体（以弥补因干燥而丢失的水分）。按此法注入 1%~5% 胚体积的荧光标记的蛋白质液。

6. 微注射成功后，从载玻片上取下盖玻片进行镜下观察。应用微注射荧光标记蛋白技术给活体样本加样及应用共聚焦显微镜分析技术研究其动力学，不仅在上述实验得到应用，而且还适用于其他方面：果蝇卵内微注射可以观察减数分裂过程其胞质早熟时细胞骨架的重组过程；将荧光标记的肌动蛋白及抗-P 颗粒抗体微注入线虫 (*C.elegans*) 卵中，能分别观察到线虫胚中皮质肌动蛋白的动力学变化及胞浆颗粒的分离情况；将罗丹明标记的微管蛋白负载入蟾胚中，应用活体共聚焦分析技术可以研究微管与皮质旋转的关系；将荧光标记的微管蛋白注入斑马鱼合子中，应用活体共聚焦显微镜观察分裂球早期的胞质分裂 (S. Jesuthasan)；此法还用于乌贼轴突以观察轴突运输。

第二篇

荧光探针及其应用技术

第二十章 荧光探针的发展简史

第一节 荧光染色和荧光探针

一、荧光染色

某些物质吸收了与它本身的特征频率相同的光量子后，其分子被激发到较高的能级，从而产生吸收光谱。有些物质，当用紫外线照射时，它吸收了某种波长的光后还会发射出各种颜色和不同强度的光；而当紫外光停止照射后，这种光线也随之消失，通常把这种光称为荧光。荧光的波长比吸收的紫外光的波长要长些。由于物质的分子结构不同，所吸收的紫外光和所发射的荧光的波长也不同。被这些物质吸收的紫外光称为激发光，产生的发射光即荧光。荧光的颜色多为红色、蓝色、绿色和黄色等，荧光是发光体分子中原子的核外电子由高能级回跳到低能级所产生的辐射，因此是冷光。物质的荧光有两种：一种是自发性荧光，即组织在短波长光照射下自行发射出的荧光，人组织中的蛋白质和脂类在紫外光照射下能发出微弱的淡蓝色荧光；另一种荧光是诱发荧光，即组织与荧光色素结合后，经一定波长的光线照射后发出的荧光，常用的是诱发荧光。能产生荧光的生物染色剂称为荧光染料（荧光色素）或荧光探针，组织或细胞的荧光染色只有在配备了适当光源的荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜下才能显示和观察。

荧光染色的优点是灵敏度高。非荧光染料的浓度通常要在 1/100 以上才能使组织细胞染上肉眼可见的颜色，而荧光染料如荧光黄在 10^{-5} 的浓度染色后，用紫外光就可激发出肉眼可见的荧光。荧光染料的应用浓度在 10^{-4} ~ 10^{-5} 时即可达到理想的染色效果。

二、荧光的发射原理

分子都含有电子，电子在不停地运动着。根据量子理论，运动着的电子可以处于一系列不连续的能量状态（即能级）中，电子遵守一定的规则，可以从一个能级向另一个能级跃迁，并伴随着与能级差相对应的特定能量的吸收或释放。一般情况下，电子总是处于能量最低的能级（基态）。在一定的条件下，电子可吸收能量（如光能、热能、电能、机械能等）跃迁到较高能级（激发态），这个过程叫激发。处于激发态的电子是不稳定的，它总是要跃迁回到基态，并将多余的能量释放出去。跃迁方式可以是辐射跃迁，也可以是非辐射跃迁。以非辐射方式跃迁时，能量大多转化成热能，而以辐射方式跃迁时，能量转化成相应波长的光，这个过程叫发射。

跃迁到激发态的电子，大多处于单重激发态。如果电子直接从单重激发态以辐射方式跃迁到基态，而由于单重激发态很不稳定，半衰期很短，所以发射持续的时间也很短，这种发射光叫荧光（图 20-1），其寿命较短。1838 年，Brewster 首先描述了荧光现象，但荧光一词，是由 Stokes 在 1852 年提出的。处于激发态的电子还可能先弛豫到三重激发态，再以辐射方式跃迁到基态，由于三重态的半衰期较长，发射持续的时间也较长，其发射光叫磷光，寿命较长。

三、荧光与荧光物质的分子结构

荧光染料和非荧光染料在结构上都含有发色团和助色团，在单色光照射下都能吸收能量，但为什么只有荧光染料才发射荧光呢？这主要与荧光染料的分子结构特征有关，同时也不是所有单色光都能激发

荧光染料辐射出荧光。荧光染料要发生荧光，物质分子必须具备电子吸收光谱的特征结构，激发光必须具备合适的能量，此外这些物质还必须具有高的荧光效率。荧光效率即荧光量子产率，它可用物质所发射出的荧光量子数和所吸收激发光的量子数的比值表示，此值往往小于1。荧光量子产率等于发射荧光的量子数目除以吸收激发光的量子数目，如罗丹明B在乙醇中的荧光量子产率为0.97，荧光黄在水中的荧光量子产率为0.65。而许多吸光物质的荧光量子产率很低，不能产生荧光。因为这些物质吸收了激发光的能量后，再把这部分能量释放出来时，太多用于同类分子或其他分子碰撞时的消耗，以热能的形式释放，因此无荧光发射。

有机化合物分子中具有 π 电子共轭结构者，其荧光效率随着 π 电子共轭程度的增加而增大，所发生的荧光光谱也将向长波长方向移动。任何有利于提高 π 电子共轭程度的结构改变，都能提高荧光效率或使荧光波长长移。荧光物质的分子结构，具有刚性结构和平面结构的 π - π 共轭体系。分子不会以C-C单键自由旋转（刚性）， π - π 共轭体系必须是共平面的，否则无法形成大的共轭体系。在共轭体系中使处于激发态的 π 电子有宽广的离域（ π 电子的活动度）范围，使其在激发态时具有一定的稳定性，能够维持 10^{-8} s左右，为使能量向荧光转化提供必要的时间。非荧光染料虽然也有 π - π 共轭体系，但不具备刚性结构和共平面的 π - π 共轭体系，因此不发荧光。

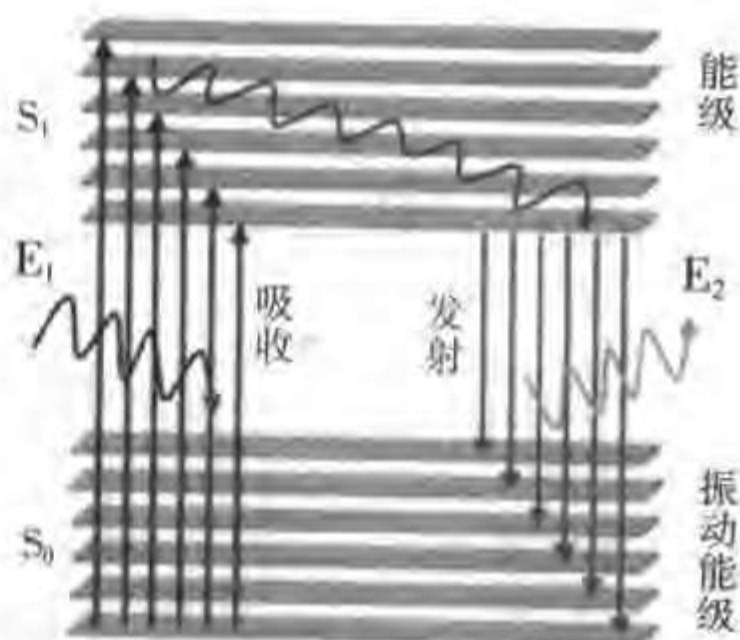


图 20-1 光能的吸收、转移和发射示意图。 S_0 ：基态； S_1 ：较高的能级； E_1 ：激发能量； E_2 ：发射能量；

四、荧光探针

在生物染色剂中，有一类可被紫外光或蓝紫光（短波长光）激发而发射荧光的染料，称为荧光染料（荧光色素），现在应用的一些染料也可被长波长光线激发，这些荧光色素常统称为荧光探针。常用的荧光染料大多数属于吖啶类，如吖啶橙、吖啶黄、罗丹明、荧光黄钠等，还有金胺-O、樱草素等。按其化学反应性可将荧光染料分为三类：

1. **碱性荧光染料** 含碱性助色团，在酸性溶液中电离，荧光色离子为阳离子。吖啶类染料如吖啶黄能与DNA和RNA结合而染色。主要是嵌入DNA的双螺旋结构。溴化乙啶也是通过嵌入DNA而染色，在紫外光照射下发红色荧光。

2. **酸性荧光染料** 有酸性助色团，在碱性溶液中电离，荧光色离子为阴离子。

3. **中性荧光染料** 由酸性荧光染料和碱性荧光染料混合而成的一种复合染料。

第二节 染料的合成及荧光染料的早期应用

染料最早是应用在丝、麻、棉等纺织品的印染上，我国古代自黄帝时代到周朝初期（公元前1122~公元前225年）已相当发达，此时人类在染色剂和染色方面已经积累了一些知识。在1714年，Leeuwenhoek首先应用天然染色剂研究肌肉组织，用番红花浸染切片，得到了较好的结果。当时人们使用的全是从动植物和矿物中提炼的天然染料如靛青、朱砂、胭脂红等。1856年，William Perkin首先合成了一种煤焦油染料——苯胺紫（mauve, aniline purple），从此开始了人工合成染料的时代。此后，一些化学家采用Perkin的方法，以氟化苯胺作原料，相继合成了其他很多染料。1859年合成了蔷薇苯胺（品红）（rosaniline），也称为复红（fuchsin）。后来又合成了副品红（Pararosaniline）、甲基紫

(methylviolet)、龙胆紫 (gentianviolet)、结晶紫 (crystal violet)、甲基绿 (methyl green)、孔雀绿 (malachite green)、亮绿 (brilliant green)、藏红 O (safranin O)、亚甲基蓝 (methylene blue)、碳花青 (galloxyanin) 和各种偶氮染料 (如碱性棕 bismarckbrown)。随后,这些染料逐渐商品化并应用于组织标本、血液标本、细菌标本的染色,新的染色方法随之建立。

这个时期生产的具有荧光性的染料,包括氧杂蒽和吖啶 (氧杂蒽的衍生物)。派若宁 Y (pyronin Y)、罗丹明 B (rhodamine B)、荧光黄 (fluorescein)、曙红 Y (eosin Y)、赤藓红 (erythrosin) 等都是很有名的吖啶类染料。早期的吖啶类染料,有碱性染革黄棕 (Phosphine)、吖啶黄 (acridine yellow)、吖啶橙 (acridine orange)、吖啶黄素 (acriflavine) 等。有些染料,如金胺 O (auramine O)、亮磺黄素 (brilliant sulphoflavine)、中性红 (neutral red) 和副品红 (pararosaniline) 等,来源于其他试剂。

尽管本世纪初就有很多荧光探针可供使用,但人们真正用过的却很少。组织学家、细胞学家和细菌学家喜欢染色能力很强的红色、蓝色和绿色染料,而这些染料在溶液中大多没有荧光或荧光很弱。只有派若宁 Y 和曙红 Y 等红色染料是例外。吖啶类染料通常把细胞染成黄色,因而不大常用。碱性品红 (含有副品红和品红碱的混合物) 在 1863 年被 Waldeyer 引进组织学研究以后,就成为一种重要的细胞核染料,它对于细菌学,特别是对于用以证明结核杆菌这类耐酸微生物体的 Ziehl-Neelsen 法的发展起过重要影响。龙胆紫是 Weigert 和 Ehrlich 分别在 1881 年和 1882 年引入微生物技术中的,它在 1884 年就成了 Gram 染色液的主要成分。

直到荧光显微镜研制成功 20 多年后的 20 世纪 30 年代初期,吖啶类和其他荧光探针才用于固定细胞和组织的荧光显微术。Krause 的《显微技术大全》收录了很多染料,但对吖啶类染料却未提及。这部在其他方面都很有参考价值的著作中,关于荧光显微镜的章节,也只提到了其在观测组织切片自身荧光中的应用。当时的显微镜学家还没有认识到荧光探针能提高染色组织的观察灵敏度和清晰度。虽然荧光探针有很多年来被用于固定组织和细胞的染色,但在其他方面也得到应用。人们知道,在水溶液中,荧光黄会产生很强的黄绿色荧光,即使用水稀释 16×10^6 倍,其钠盐仍可产生浅绿色的荧光。Ehrlich 用它来显示眼内液体的流动。1906 年,荧光黄在美国成为第一个用于地下水示踪的荧光探针。

第三节 荧光探针在活细胞中的应用和发展

1885 年, Ehrlich 用亚甲基蓝作为第一个重要的活体染料,并阐明了它对神经组织的亲和性。吖啶染料是治疗锥虫的有效药物, Ehrlich 用吖啶黄素对付老鼠体内的这种原生动物,并取得了显著效果。这种染料也因其能影响锥虫面被称为“锥黄素”。显微镜学家用明视野显微镜观察了这类染料和微生物体的结合。Provazek 把各种荧光探针和药物 (如荧光黄、曙红、中性红、奎宁等) 加到纤毛豆形虫的培养液中,并用荧光显微镜观察了细胞的染色荧光。这种实验方法的基本目的是把各种类型的物质 (不管是染料还是无色药物) 引入细胞,假定它们服从一定的分布规律并在一定的条件下富集在细胞的特定成分中,那么它们在荧光显微镜的暗视野中就可以突出显示细胞的部分结构。1914 年,荧光探针引入荧光显微术中,标志着实验细胞学向前迈了一大步。Provazek 的报告首次描述了活体荧光探针。以前,有人用活体染料 (包括荧光探针) 进行原生动物试验,但只限于用明视野显微镜观察。1932 年匈牙利药物学家把几种不同的荧光探针注入预先感染了锥虫的啮齿动物体内,创立了活体荧光探针技术。荧光显微镜下的血涂片观察表明,染料和核酸及带血锥虫的基本部分有特异结合。20 世纪 30 年代由于对化疗特别感兴趣,人们作了各种努力,试图确定染料在什么位置和动物及人体内的疟原虫结合。人们在荧光显微镜下发现,在所试验的各种荧光探针中,奎时因 (quinacrine, 即米帕林) 在注射后的 10 s 内能被循环淋巴液选择吸收。把吖啶黄素加到成纤维细胞培养液中,在显微镜下可看到,试验浓度下它能阻止细胞的分裂。用荧光吖啶碳花青染料标记脂蛋白可在体外研究动脉粥样化形成过程中脂蛋白的代谢。

通过这些研究,人们明白某些氨基吖啶能优先和细胞核成分结合。对这种结合机理的研究,导致了

染料对核酸的亲合力的发现。这种强相互作用已被体外及低 pH 区固定细胞中的纯化核酸所阐明。

第四节 体内荧光探针

在 Ehrlich 阐明荧光黄能示踪眼内液体的流动之后, Thief 将裂隙灯显微镜加以改进, 以观察眼内染料的荧光。荧光显微镜用的光源是经聚光镜会聚的透射光, 对大多数不透明的活器官标本无法观察。1929 年, Ellinger 和 Hirt 对荧光显微镜作了重大改进, 在这种荧光显微镜中, 光源的垂直入射光直接通过侧边的透光管经物镜会聚于样品上, 发射的荧光沿透光管返回到观察者眼中。别的基本部件还有相应的滤光片和一个浸在水中的物镜。这台被称作“体内活体显微镜”的仪器, 可以认为是第一台落射荧光显微镜。他们用这种显微镜观察了动物体内注入荧光探针后的肾脏的微循环。荧光黄和吖啶黄素的稀释溶液被用于研究尿液形成的生理学。其他很多科学家对体内活体荧光显微镜产生了兴趣, 并试验了各种荧光探针, 如亮碱性染革黄棕 G (phosphine G)、吉耳曼宁 (germanin S)、樱草灵黄 (rimulin yellow)、rheonin A、噻唑黄 (thiazole yellow)、硫黄素 (thioflavine) 等。在 20 世纪 30 年代, 人们用这种荧光新技术观察了活体皮肤、肝脏、肾脏、结膜和肾上腺。为满足生物学的需要, 活体荧光探针必须在等渗、无毒和无淬灭剂的条件下使用, Ellinger、Prince、Schwartz 和 Kasten 等人对这方面早期的研究作过综述。近年来, 由于现代落射荧光显微镜、显微荧光扫描仪、高灵敏摄像机、数据实时采集器等现代化仪器和方法的应用, 微循环的体内活体显微术又重新受到欢迎。Pascal Gervaz 等人将低密度脂蛋白进行酰化, 然后与一种荧光探针 (dioctadecyl-indocarbocyanine) 结合, 当肝窦内皮细胞摄取这种标记的低密度脂蛋白后, 便可用荧光显微镜进行鉴定。研究人员将 100 μ l 荧光标记的低密度脂蛋白经门静脉注入 BD IX 大鼠体内, 2 d 后再从门脉内注入 10^7 个 DHD K12 细胞, 这是一种化学诱导生成的 BD IX 大鼠结肠癌细胞系。一周后处死大鼠, 取出肝脏标本进行常规组织学检查, 并用大鼠内皮细胞单克隆抗体进行免疫组织化学染色。结果发现: 在正常肝实质组织中, 肝窦内皮细胞出现荧光, 而大血管内皮未出现荧光染色, 说明仅肝窦内皮细胞能摄取乙酰化的低密度脂蛋白。在发生肿瘤转移的肝脏内出现荧光的空间梯度, 标记的内皮细胞聚集在转移灶的周围。当转移灶超过 200 μ m 后, 便出现新生血管的形成, 同时荧光标记的细胞从周围侵入转移灶内, 并在肿瘤体内排列成管状。还有人用该显微镜和吖啶橙对啮齿动物的肝脏微循环进行了定量研究。

第二十一章 荧光探针的性质及滤光片的选择

荧光探针产生荧光的强弱，除与分子结构有关外，环境条件对其也有重要影响。一些非荧光染料如孔雀绿在明胶中，可发生荧光，而在水中则无荧光。荧光染料如荧光黄，如果处于晶态，可发生荧光淬灭（荧光减弱或消失）。因此，在染色过程中要十分注意荧光探针的性质及其影响因素。

第一节 荧光探针的性质

一、激发波长和发射波长

电子跃迁时吸收或发射的能量并不是任意的，而是受到电子能级的制约，只能吸收或发射一定波长范围内的光。荧光探针大多是含有共轭双键体系的有机化合物，共轭双键使其容易吸收激发光，其激发波长大多处于近紫外区或可见光区，发射波长多处于可见光区。激发波长和发射波长决定了使用什么样的光源，选择什么样的滤光片。例如，如果染料的激发波长处于紫外区，则必须使用紫外光源。

染料的发射波长总是大于其激发波长，两者的差值叫斯托克斯（stokes）位移。有些染料的斯托克斯位移较大，而有些染料的斯托克斯位移较小。染料的斯托克斯位移越大，其激发光谱和发射光谱的重叠就越少，越有利于提高其分辨率。

二、荧光强度

荧光强度决定了荧光染料检测的灵敏度。它本身又取决于染料的摩尔消光系数和荧光的量子产率，在确定的条件下，两者均为定值。摩尔消光系数反映了染料吸收激发光的能力，而量子产率反映了染料将吸收的辐射能转化成荧光的效率。当荧光探针与细胞结构或生物分子结合时，其量子产率应接近或大于 0.4，否则没有实用价值。

三、荧光寿命

荧光寿命（即激发态寿命），是指分子在激发态的平均停留时间。若分子受激发后迅速弛豫，则可实现多次激发，所以荧光寿命短时可提高灵敏度。大多数荧光探针的荧光寿命在纳秒级，如荧光素为 4 ns。特别长的荧光寿命对于高灵敏度检测也很有意义。例如，利用稀土离子配合物的长寿命荧光而建立的时间分辨荧光测量技术，可极大地提高检测的灵敏度。所谓时间分辨荧光测量技术，就是采用时间延迟技术，在激发后延迟一段时间，待短寿命的散射光和自身本底荧光等干扰信号衰减后，再测量荧光探针特异的荧光信号，这样可大大排除干扰信号，提高检测的特异性和灵敏度。

四、光稳定性

提高激发光的强度固然可以提高信号的强度，但激发光的强度不是可以无限提高的。因为激发光的强度超过一定限度时，光吸收就趋于饱和，并不可逆地破坏激发态分子，这就是光漂白现象。对于流式

细胞术而言,光漂白的问题并不严重,因为光源照射细胞的时间很短;但对于荧光显微镜等而言,光源需长时间照射样品,光漂白现象就会严重影响测量。解决光漂白问题最直接的方法是提高测量的灵敏度,以降低光照的强度。

五、染料分子间的相互作用

大多数染料都有浓度依赖式的自身荧光淬灭现象,即浓度高时荧光反而减弱。荧光淬灭是指由于分子间的相互作用,降低了荧光量子产率而不改变荧光发射光谱的一种双分子作用过程。其机制可能是由子激发态分子以非辐射方式将能量传递给邻近分子而不能发射荧光。有些激发态分子还可相互作用形成激发态二聚体(excimers),使发射光谱发生位移,这种性质可以运用于双波长比率测量。

六、染料分子对环境的敏感性

染料的荧光光谱和量子产率是受环境影响的,这也是许多染料具有探针作用的基础。影响染料荧光性质的环境因素主要有:

1. **染液的 pH 值** 荧光探针是否发射荧光,辐射何种荧光与它们在溶液中的存在状态有关,如 1-萘酚-6-磺酸呈负一价离子时无荧光,呈负二价离子时才能发射蓝色荧光; α -萘胺呈分子状态时发射蓝色荧光,而呈一价离子时荧光消失。荧光探针中都含有酸性或碱性助色团,溶液的酸碱性对它们的电离有影响,如 1-萘酚-6-磺酸在 pH 6.4~7.4 的溶液中会发射蓝色荧光,当 pH 低于 6.4 时,就不发射荧光。不电离的荧光探针在各种 pH 溶液中都可发射荧光。pH 值可影响有机试剂的电离,也影响金属络合物的组成,因此, pH 值对金属络合物的荧光影响大。

2. **温度** 荧光探针的荧光量子产率和荧光强度通常随溶液温度的降低而增加,如荧光黄的乙醇溶液在 0℃以下,每降低 10℃,荧光量子产率增加 3%,冷至 -80℃时,荧光量子产率接近 100%;反之则减弱。温度升高,分子热运动加大,分子碰撞几率增加,使处于激发态的 π 电子难以维持稳定,导致荧光的淬灭。一般在 20℃时,温度引起的荧光淬灭作用就有表现,随着温度的升高,淬灭作用加剧。在 20℃以下荧光量子产率随温度变化不太明显,因此进行荧光染色过程中,为获得良好的染色效果,应注意温度的控制。

3. **光分解作用** 当激发光源能量过大时,可使荧光探针分子中的共价键发生断裂,分子结构破坏,将使激发能大部分消耗,因此无荧光发射。故在实际应用中,在满足镜下观察的最高灵敏度条件下,应选择适当的激发强度(功率)。

4. **溶剂性质对荧光探针的影响** 溶剂的性质对荧光探针的荧光强度有明显影响。同种荧光探针在不同的溶剂中,其荧光光谱的位置和强度都有差别,一般是荧光峰的波长随着溶剂的介电常数增大而增大。如 8-羟基喹啉在乙腈、丙酮、氯仿中的荧光量子产率随着溶剂极性的降低(介电常数降低)而依次递减。如果溶剂和荧光探针形成了化合物或溶剂使荧光探针的电离状态改变,则荧光峰的波长和强度都会发生很大变化。在苯胺或萘胺的稀溶液中加入少许盐酸,由于形成盐酸盐,其荧光消失。

5. **荧光探针浓度的影响** 浓度对荧光强度的影响更明显。在稀溶液中的荧光强度与荧光探针的浓度呈线性关系;浓度增加到一定程度时,荧光强度保持恒定,即使再增加浓度,荧光强度也不发生变化;若浓度再继续增加,超过一定限度,荧光强度将随着浓度的增加而减弱。荧光探针染液的应用浓度一般为 10^{-3} ~ 10^{-5} 。

6. **荧光探针和其他生物分子结合的影响** 有些染料结合到生物分子上后,荧光比原来在水溶液中明

显增强。比如核酸探针碘化丙锭 (PI) 在与核酸结合后, 荧光增强约 20 倍; 膜探针二苯基己三烯 (DPH) 与膜结合后荧光也大大增强。溶剂的极性对染料的荧光有很大的影响, 特别是那些激发态分子具有很大的偶极矩的染料, 氨基蔡类染料丹磺酰就是典型的例子。

7. 荧光的淬灭 由于各种原因, 使荧光探针的荧光强度降低, 以致与荧光探针的浓度不呈线性关系, 这种现象称为荧光的熄灭能够 (荧光淬灭)。主要原因是由于是荧光探针和溶剂或其他溶质分子的相互碰撞或电子转移等作用所引起的。能够引起荧光淬灭的物质称淬灭剂, 如卤素离子、重金属离子 (配位数较大的金属离子)、具有氧化性的有机化合物 (硝基化合物、重氮化合物、羰基化合物、羟基化合物等)、氧分子。

外源性的淬灭剂如氧分子, 以浓度依赖的方式淬灭染料的荧光。通常情况下, 淬灭是由于碰撞引起的, 这时通过研究淬灭剂对染料荧光的淬灭作用, 可获得淬灭剂与荧光基团的亲和性及其扩散速率的信息。蛋白质也可淬灭许多荧光团的荧光, 例如荧光素或 NBD 的抗体是各自有效而特异的荧光淬灭剂。荧光探针的浓度大于 1g/L 时, 常发生荧光的自灭现象, 这是由于被激发的分子在发生荧光前和未激发的分子碰撞或由于荧光探针分子间缔合而形成二聚体或多聚体的关系。

氢离子探针, 如 BCECF 和 SNAFL 等, 其激发或发射光谱对 pH 很敏感, 可用于监测 pH 值。但有时又要求染料对 pH 值不敏感, 则可选用对 pH 不敏感的染料, 如 BODIPY 类染料。

考虑到以上因素, 在进行荧光探针实验时除注意合适的 pH 值、溶剂、温度等条件外, 染色溶液最好新鲜配制, 配高浓度的储存液, 在临用前稀释, 避免因储存时间过长而失效。另外, 利用染料对环境的敏感性可以设计所需要的探针。例如, 在对 pH 敏感的荧光素的 6'-羟基上连上半乳糖, 得到的二半乳糖苷荧光素 (FDG) 就是检测 β -半乳糖苷酶活性的特异性探针, 因为 FDG 的荧光很弱, 而经过 β -半乳糖苷酶的作用后生成的荧光素具有很强的荧光。

第二节 滤光片的选择

选择滤光片要根据所用的光源、染料的激发波长和发射波长综合分析, 加以选择搭配, 其目的是提高特异信号的强度, 降低非特异信号的强度, 最大限度提高检测灵敏度和分辨率。

一、常用的光源

常用的紫外和可见光源有: 汞灯 (360、405、435、545、575、615、690 nm)、氙 (连续光)、氩离子激光器 (488、514nm)、氩-氦激光器 (488、568、647 nm) 和氦-氖激光器 (543、594、633 nm) (注: 括号内的数字为该光源的常用波长)。

二、滤光片的分类

根据滤光片对不同波长的光的作用特点, 可将滤光片分为以下几种:

1. **长波通滤光片** 允许波长大于某一波长的光波通过, 其他光被吸收 (表 21-1)。
2. **短波通滤光片** 允许波长小于某一波长的光波通过, 其他光被吸收。
3. **带通滤光片** 允许某一波段范围内的光波通过, 其他光被吸收 (表 21-2, 表 21-3)。
4. **分色镜** 允许波长大于某一波长的光波通过, 其他光被反射。

三、滤光片的选择原则

应根据染料的光谱特点和滤光片的关系进行滤光片选择。一种典型的长波通发射滤光片可发射波长不低于 530 nm 的所有光线，而典型的带通滤光片仅可发射波长在 515 nm~545 nm 之间的光线。当需要进行最大发射采集和不需要进行光谱鉴别时，应使用长波通滤光片。当背景自发荧光水平较低，而荧光探针产生的激发波长相对单一时，可考虑长波通滤光片，也可用同时检测光谱差异明显的双激发探针进行检测，如 JC-1 (T-3168) 的单体和 J-聚体、BODIPY FL C5-神经酰胺 (D-3521) 的单体和激发态二聚体。带通滤光片可使信噪比最大化，当信号成分的辨别比总体图像的亮度更重要时，应选用带通滤光片。为达到最佳的信噪比检测或准确的颜色表现，也应考虑光谱检测器的灵敏度。在激光扫描共聚焦显微镜则采用敏感的光电倍增管 (PMT) 进行检测，对于定量图像分析或显微荧光光度术 (microspectrofluorometry)，则采用线性光度术电荷偶合装置 (CCD)、二极管阵列、增强视频照相机，双、三、四带通滤光片组可用来同时检测二、三、四种荧光团。荧光显微镜检查时，选择最理想的滤光片组应使光学滤光片的规格与染料的光谱特点匹配，应仔细进行比较，某些染料在应用时，可能与报道的染料在溶液中的光谱具有不同的特点。许多核酸染料的光谱特点取决于是在水溶液中，还是与 DNA、RNA 结合。相似地，苯乙烯基染料如 FM 1-43 (T-3163) 和双-4-ANEPPS (D-1199) 的最大激发波长与它们是溶解于溶剂中，还是与膜结合有关。为便于选择，可参考表 21-1~表 21-3 中列出的荧光探针及其建议使用的滤光片组。表中列出了荧光探针最常应用的环境中的最大激发和发射波长。解笼锁和多光子应用可访问以下网址：<http://www.omegafilters.com>, <http://www.chroma.com>。

表 21-1 分子探针公司可提供的长波通滤光片

产品编号	激发波长 (nm)	二色性 (nm)	发射波长 (nm)	可选用的染料
O-5702	330±30	400	≥400	aminomethylcoumarin, Hoechst, DAPI, AMCA
O-5703	365±8	390	≥400	aminomethylcoumarin, Hoechst, DAPI, 4-methylumbelliferone, ACAM, Cascade Blue
O-5705	365±8	390	≥515	6-Aminoquinoline, dansylamide
O-5710	425±23	475	≥515	Lucifer Yellow, mithramycin; quinacrine
O-5711	455±35	505	≥515	mustard, BOBO-1 Generic blue/green combination
O-5712	470±18	505	≥515	NBD amine, AO (+ DNA)
O-5717	485±11	505	≥530	Fluorescein, BODIPY ceramide, DiO, Nile Red, BODIPY FL, fluo-3, BCECF, YOYO-1, rhodamine 123, TOTO-1, Calcium Green, calcein
O-5721	515±1	565	≥590	Tetramethylrhodamine, R-PE, B-PE, DiI, 7-AAD, POPO-3, rhodamine phalloidin
O-5722	535±18	565	≥590	Tetramethylrhodamine, Lissamine rhodamine, R-PE, B-PE, DiI, 7-AAD, POPO-3
O-5729	546±5	564	≥590	Tetramethylrhodamine, rhodamine phalloidin, R-PE, B-PE, DiI, thiocarbocyanine, CY-3, resorufin, Calcium orange
O-5730	560±20	590	≥600	Lissamine rhodamine B, BOBO-3, rhodamine X, Calcium Crimson, resorufin
O-5738	670±10	690	≥700	Generic red combination
O-5739	740±13	770	≥780	Indotricarbocyanine, CY-7

表 21-2 分子探针公司可提供的带通滤光片

产品编号	激发波长 (nm)	二色性 (nm)	发射波长 (nm)	可选用的染料
O-5700	254±13	300	330±30	Generic ultraviolet combination
O-5701	330±30	400	450±33	Hoechst, DAPI, AMCA, aminomethylcoumarin
O-5704	365±8	400	450±33	Cascade Blue, 4-methylumbelliferone, Hoechst, DAPI, AMCA, aminomethylcoumarin
O-5706	365±8	390	535±18	Dansylamide, 6-aminoquinoline
O-5707	380±8	420	450±33	SITS, DIDS, CPM
O-5708	400±8	420	450±33	Cascade blue, POPO-1
O-5709	425±23	475	535±28	Lucifer Yellow, mithramycin, BOBO-1
O-5713	470±18	505	535±28	NBD-amine, AO (+DNA)
O-5714	480±30	530	635±28	AO (+RNA)
O-5715	485±11	505	530±15	Fluorescein, BODIPY FL, fluo-3, BCECF, DiO, YOYO-1, rhodamine 123, TOTO-1, Calcium Green, calcein
O-5716	485±11	505	535±18	Fluorescein, BODIPY FL, fluo-3, BCECF, DiO, YOYO-1, rhodamine 123, TOTO-1, Calcium Green, calcein
O-5718	490±10	515	660±25	Fura red
O-5719	510±12	540	605±25	EB (+DNA)
O-5723	535±18	570	590±18	Tetramethylrhodamine, R-PE, B-PE, DiI, Lissamine rhodamine B, POPO-3
O-5724	535±18	575	605±25	Tetramethylrhodamine, R-PE, B-PE, DiI, Lissamine rhodamine B
O-5725	535±18	575	635±28	Propidium iodide, ethidium homodimers
O-5726	535±18	585	660±16	7-ADD
O-5728	546±5	560	580±15	Tetramethylrhodamine, R-PE, B-PE, DiI, Calcium orange, rhodamine phalloidin, resorufin, CY-3, DiS
O-5731	560±20	595	610±10	Rhodamine X, calcium crimson, BOBO-3
O-5732	560±20	595	635±28	Rhodamine X, calcium crimson
O-5733	580±14	600	630±15	Texas red, YOYO-3, C-phycoerythrin, R-phycoerythrin
O-5734	590±23	620	660±16	Texas red, allophycocyanin
O-5735	610±10	645	670±20	Allophycocyanin, indodicarbocyanine
O-5736	633±15	645	670±20	Cy5, TOTO-3, indodicarbocyanine
O-5737	640±10	670	682±11	Cy5, TOTO-3, indodicarbocyanine, thiadicarbocyanine

表 21-3 分子探针公司荧光探针的光谱特性及推荐的带通滤光片

荧光探针	最大激发波长 (nm)	最大发射波长 (nm)	Omega 滤片 *	Chroma 滤片 *
Acridine orange	500 (+DNA)	526 (+DNA)	XF104 (DNA)	41001 (DNA)
	460 (+RNA)	650 (+RNA)	XF21 (RNA)	31001 (RNA)
Alexa Fluor 350 dye, AMC+	347	442	XF136 XF06	31000 31013
Alexa Fluor 430 dye	434	540	XF14	31010
Alexa Fluor 488 dye	495	519	XF100 XF23	41001 31001
Alexa Fluor 532 dye	531	554	XF104 XF99	41011
Alexa Fluor 546 dye	556	573	XF108 XF32	41002 31002
Alexa Fluor 568 dye	579	604	XF102 XF41	41034 31004
Alexa Fluor 594 dye	591	618	XF102 XF43	41004 31004
Alexa Fluor 633 dye	632	647	XF110 XF70	41008 31023
Alexa Fluor 647 dye	650	668	XF110 XF47	41008 31023
Alexa Fluor 660 dye	663	690	XF110	41022 31027
Alexa Fluor 680 dye	679	702	XF110	41022 31029
Allophycocyanin	650	660	XF44 XF45	41013 31006

续表

荧光探针	最大激发波长 (nm)	最大发射波长 (nm)	Omega 滤片 *	Chroma 滤片 *
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	546	647	XF103 XF35	41005
BCECF indicator	482 (低 pH) 503 (高 pH)	520 (低 pH) 528 (高 pH)	XF16 **	71001 **
BOBO-1, BO-PRO-1	462	481	XF114	31044
BODIPY 630/650 dye	630	650	XF110 XF70	41008 31023
BODIPY 650/665 dye	650	665	XF110 XF47	41008 31023
BODIPY FL dye	505	513	XF100 XF23	41001 31001
BODIPY TMR-X dye	542	574	XF108 XF32	41002 31002
BODIPY TR-X dye	589	617	XF102 XF43	41004 31004
Calcein	494	517	XF100 XF23	41001 31001
Calcium Crimson indicator	590	615	XF102 XF43	41004 31004
Calcium Green indicators	506	533	XF104 XF23	41028 31001
Calcium Orange indicator	549	576	XF108 XF32	41002 31002
6-Carboxyrhodamine 6G	525	555	XF104 XF99	41011
Carboxy SNARF indicators	548 (低 pH) 576 (高 pH)	587 (低 pH) 635 (高 pH)	XF72 §	71005 §
Cascade Blue dye	400	420	XF113 XF10	31021 31009
Cascade Yellow dye	402	545	XF14	31038
DAPI	358	461	XF136 XF06	31013 31000
Di-8-ANEPPS, Di-4-ANEPPS [†]	468	635	XF17 **	71006 **
DiA	456	590	XF21	31024
DiD (DiIC ₁₈ (5))	644	665	XF110 XF47	41008 31023
DiI (DiIC ₁₈ (3))	549	565	XF108 XF32	41002 31002
DiO (DiOC ₁₈ (3))	484	501	XF100 XF23	41001 31001
DiR (DiIC ₁₈ (7))	750	779	XF112	41009
ELF 97 alcohol	345	530	XF09	
Eosin	524	544	XF104	41011
ER Tracker Blue -White DPX [†]	375	520	XF09	31034
EthD-1 [†]	528	617	XF103 XF35	41005 31005
Ethidium bromide [†]	518	605	XF103 XF33	41006 31008
Fluorescein, FITC	494	518	XF100 XF23	41001 31001
Fluo-3 indicator	506	526	XF104 XF23	41028 31001
Fluo-4 indicator	494	516	XF100 XF23	41001 31001
FM 1-43 [†]	479	598	XF21	31024
FM 4-64 [†]	506	750	XF103XF27	4100531012
Fura-2 indicator	363 (低 [Ca ²⁺]) 335 (高 [Ca ²⁺])	512 (低 [Ca ²⁺]) 505 (高 [Ca ²⁺])	XF04 **	71000 **
Fura Red indicator	472 (低 [Ca ²⁺]) 436 (高 [Ca ²⁺])	657 (低 [Ca ²⁺]) 637 (高 [Ca ²⁺])	XF17 **	71003 **
Hoechst 33258, Hoechst 33342 [†]	352	461	XF136 XF06	31013 31000
7-Hydroxy-4-methylcoumarin	360	455	XF136 XF06	31013 31000
Indo-1	346 (低 [Ca ²⁺]) 330 (高 [Ca ²⁺])	475 (低 [Ca ²⁺]) 401 (高 [Ca ²⁺])	XF07 §	71002 §
JC-1	498 (单体) 593 (多聚体)	525 (单体) 595 (多聚体)	XF26 §	71010 §
JC-9	506	525 (单体) 635 (多聚体)	XF26§	71010§
JOE dye	525	555	X104 XF99	41011

续表

荧光探针	最大激发波长 (nm)	最大发射波长 (nm)	Omega 滤片 *	Chroma 滤片 *
LaserPro IR 790 dye	795	811	XF112	41009
Lissamine rhodamine B	570	590	XF102 XF41	41034 31004
Lucifer yellow CH	428	536	XF96 XF14	32000 31010
LysoSensor Blue DND-167	374	425	XF06	31013
LysoSensor Green DND-153, DND-189	442	505	XF71	32000
LysoSensor Yellow/Blue	384 (低 pH) 329 (高 pH)	540 (低 pH) 440 (高 pH)	XF04 ** XF07 §	71000 **71002 §
LysoTracker Green	504	511	XF100 XF23	41001 31001
LysoTracker Red	577	592	XF102 XF41	41034 31004
Magnesium Green indicator	506	531	XF104 XF23	41028 31001
Marina Blue dye	365	460	XF136 XF06	31000 31013
MitoTracker Green FM	490	516	XF100 XF23	41001 31001
MitoTracker Orange CMTMRos	551	576	XF108 XF32	41002 31002
MitoTracker Red CMXRos	578	599	XF102 XF41	41034 31004
Monobromobimane ¹¹	394	490	XF76	32000
NBD	465	535	XF100 XF23	41001 31018
NeuroTrace 500/525 green [†]	500	525	XF100 XF23	41001 31001
fluorescent Nissl stain	549	628	XF103 XF35	41005 31014
Nile red [#]	496	524	XF100 XF23	41001 31001
Oregon Green 488 dye and Oregon Green 488 BAPTA indicators				
Oregon Green 514 dye	511	530	XF104	41026
Pacific Blue dye	405	455	XF119 XF11	31037
POPO-1, PO-PRO-1 [†]	434	456	XF114	31044
Propidium iodide [†]	536	617	XF103 XF35	41005 31005
Rhodamine 110	496	520	XF100 XF23	41001 31001
Rhodamine Red dye	570	590	XF102 XF41	41034 31004
R-phycoerythrin	565	575	XF108 XF32	41002 31014
Resorufin	570	585	XF39	41010
RH 414 [#]	500	635	XF21	31011
Rhod-2 indicator	552	578	XF108 XF32	41002 31002
Rhodamine Green dye	502	527	XF100 XF23	41001 31001
Rhodol Green dye	499	525	XF100 XF23	41001 31001
Rhodamine 123	507	529	XF104 XF23	41028 31001
Sodium Green indicator	507	535	XF104 XF23	41028 31001
SYTO blue fluorescent nucleic acid stains 40, 41, 42, 43 [†]	428 ± 6	454 ± 13	XF119	31037
SYTO blue fluorescent nucleic acid stains 44, 45 [†]	450 ± 5	478 ± 7	XF114	31036 31044
SYTO green fluorescent nucleic acid stains 12, 13, 16, 21, 23, 24 [†]	494 ± 6	515 ± 7	XF100 XF23	41001 31001
SYTO green fluorescent nucleic acid stains 11, 14, 15, 20, 22, 25 [†]	515 ± 7	543 ± 13	XF104 XF99	41026 41028
SYTO orange fluorescent nucleic acid stains 80, 81, 82, 83 [†]	537 ± 7	552 ± 8	XF99 XF104	41011

续表

荧光探针	最大激发波长 (nm)	最大发射波长 (nm)	Omega 滤片 *	Chroma 滤片 *
SYTO orange fluorescent nucleic acid stains 84, 85 [†]	567	583	XF39	41010 31002
SYTO red fluorescent nucleic acid stains 17, 59, 61, 64 [†]	615 ± 15	632 ± 13	XF43 XF44	31006
SYTO red fluorescent nucleic acid stains 60, 62, 63 [†]	655 ± 3	675 ± 3	XF110 XF47	41008 31023
SYTOX Blue nucleic acid stain [†]	445	470	XF114	31036 31044
SYTOX Green nucleic acid stain [†]	504	523	XF104 XF23	41028 31001
SYTOX Orange nucleic acid stain [†]	547	570	XF108 XF32	41002 31002
Tetramethylrhodamine, Rhodamine B	555	580	XF108 XF32	41002 31002
Texas Red dye	595	615	XF102 XF43	41004 31004
TOTO-1, TO-PRO-1 [†]	514	533	XF104 XF99	41028 41026
TOTO-3, TO-PRO-3 [†]	642	660	XF110 XF47	41008 31023
X-Rhodamine	580	605	XF102 XF41	41034 31004
YOYO-1, YO-PRO-1 [†]	491	509	XF100 XF23	41001 31001
YOYO-3, YO-PRO-3 [†]	612	631	XF43 XF44	31006

注：*Omega 滤片由 Omega Optical, Inc.提供；Chroma 滤片由 Chroma Technology Corp. 提供；AMC = 7-amino-4-methylcoumarin；[†]列出的值为荧光探针/核酸复合物的激发和发射峰值；§ 双波长发射滤片组，** 双波长激发滤片组；^{*}列出的值为脂结合荧光探针的激发和发射峰值；^{††}列出的值为谷胱甘肽交联荧光探针的激发和发射峰值。

第三节 荧光抗衰减剂的选择

标记标本的荧光褪色/漂白是在荧光显微镜检查时遇到的主要问题。激光扫描共聚焦显微镜由于具有更强的功率和聚焦更准确的光束，因此，与普通荧光显微镜相比，标本的光漂白作用更为明显，荧光团的荧光可在连续的观察过程中逐渐减弱或消失。抗衰减剂的应用可减慢荧光衰减的过程，获得更长的观察时间进行荧光测定术（或荧光定量分析）和模式识别（pattern recognition）。许多因素对荧光强度和荧光团的光漂白有影响，如激发光的强度（功率）、pH 值、溶液的性质、其他使荧光淬灭物质的存在等。已经提出几种光漂白的假说，包括氧自由基的损伤作用和蛋白变性。在进行荧光探针的荧光标记后，常存在各种因素导致荧光淬灭或衰减，因此在许多情况下应考虑使用抗荧光衰减剂。一些常用的和最有效的荧光抗衰减剂的优缺点比较如下：

一、常用的抗荧光衰减剂

1. p-苯二胺（phenylenediamine, PPD） 尽管它是最有效的抗衰减剂之一，但对光和热都有较强的敏感性，而且具有毒性，因此也限制了在体内研究的应用。Krenik 等建议最理想的 PPD 抗衰减剂混合液配方是：90%甘油、10% PBS，其中 PPD 浓度在（2~7）mmol/L 之间，最终 pH 值为 8.5~9.0。

2. n-丙基没食子酸盐（propyl gallate, NPG） NPG 无毒性，对光和热稳定，但抗荧光漂白的效果不如 PPD，可用于体内研究。推荐浓度在（3~9）mmol/L，用甘油配制效果也不错。

3. 1,4-二偶氮双环 [2,2,2] -辛烷（1,4-diazobicyclo [2,2,2] -octane, DABCO） DABCO 是一种非离子性、稳定性的抗衰减剂，价格便宜而且容易使用，可用于体内研究。

另外，维生素 C 也有一定的抗荧光漂白作用。

二、抗荧光衰减（淬灭）试剂盒

经过不可逆的光漂白过程可导致荧光强度的显著降低或消失，将明显降低检测的敏感性，尤其在目标分子的含量相对较低、激发光较强或持续检测时间较长的情况下更为明显。为减少实验样本的光漂白作用，分子探针公司专门生产了几种抗荧光衰减试剂盒：ProLong、SlowFade 和 SlowFade Light，已经证明它们可增强许多用于固定细胞和组织以及游离细胞标本的荧光探针的光稳定性。抗衰减剂的主要功能是保持荧光探针的荧光强度，通常是通过抑制活性氧基的产生和释放而发挥作用的。另外，还可通过采取以下措施使活细胞或非活性标本的荧光强度得到增强：① 使用中密度滤片；② 采用高数值孔径的物镜；③ 相对较低的放大倍数；④ 高质量光学滤片和高速胶片；⑤ 高效能检测器。常用试剂盒简介如下：

1. ProLong 抗衰减试剂盒 ProLong 抗衰减试剂盒（P-7481）的组成成分包括：① ProLong 抗衰减剂粉末；② ProLong 封片剂；③ 标本封片过程的实验步骤。

使用该试剂封片，可使大多数荧光探针的荧光淬灭减弱或不发生荧光淬灭。牛肺动脉内皮细胞（BPAE）用荧光黄次毒蕈环肽（F-432）标记，用 PBS 作为封片剂 30 s 后，光漂白使荧光强度下降约为初始荧光强度的 12%，而使用该试剂盒封片在同样条件下则保持不变。而且在荧光黄标记的 HEP-2 细胞，采用该试剂封片比采用含有 *p*-苯二胺的试剂封片得到的荧光强度更强。在 Texas Red 染色时，采用该试剂可显著增强其荧光强度。该试剂也可有效抑制以下荧光探针的淬灭：四甲基罗丹明（tetramethylrhodamine）、DNA-结合的核酸探针如 DAPI 及碘化丙锭（propidium iodide）和 YOYO-1（D-1306、D-21490、P-1304、P-3566、P-21493、Y-3601）。由于其适用范围较广，而且对多数荧光探针都具有抗光漂白作用，因此是进行荧光多标记的常用试剂，常应用于多种标记的荧光原位杂交（fluorescence in situ hybridization, FISH）。

2. SlowFade and SlowFade Light 抗衰减试剂盒 该试剂原始配方（S-2828）可将荧光黄的荧光淬灭速率减小到零，尤其适用于激光扫描共聚焦显微镜的定量测定，因为其在进行测定时往往要求激发强度相对较强，而且采集时间也较长，容易造成荧光淬灭。SlowFade 试剂可使荧光黄的有效荧光发射扩大 50 倍以上，用该试剂封片后，细胞和组织中的荧光信号可保持 2 年之久。原始的 SlowFade 配方实际上可使荧光黄的荧光完全淬灭，几乎也可使小瀑布蓝（Cascade Blue）和 Alexa Fluor 350 荧光团的荧光完全淬灭。为克服这种局限，分子探针公司的研究人员又研制了 SlowFade Light 抗衰减试剂盒（S-7461）。该衰减剂的配方使荧光黄的荧光衰减速率降低 5 倍，而荧光黄的初始荧光强度没有显著降低，因此使光学显微镜的信噪比显著提高。此外小瀑布蓝、Alexa Fluor 350、Texas Red 的淬灭也达到最小。实际上，SlowFade Light 抗衰减试剂盒可将小瀑布蓝的衰减速率几乎降到零，而其发射强度仅降低约 30%。每一 SlowFade 或 SlowFade Light 抗衰减剂试剂盒的组成包括：① SlowFade（S-2828）或 SlowFade Light（S-7461）抗衰减剂，储存于甘油中，即用型，足够封片 200 张；② 2× 浓缩的 SlowFade 或 SlowFade Light 抗衰减剂溶液，用于哪些不适合用甘油作为封片液的实验中；③ 平衡缓冲液，可提高样品的 pH 值，增加两种抗衰减剂配方的保护作用；④ 详细的标本封片步骤说明。

另外，还有用于蓝色核染料荧光探针 DAPI 的 SlowFade 和 SlowFade Light 抗衰减试剂盒（S-24635, S-24636），在同时进行标记时，加入该试剂有防止光漂白的作用。SlowFade 试剂盒与 ProLong 试剂盒不同，使用时不需要混合，将荧光标记的标本用提供的平衡缓冲液简单洗涤后，即可将封片剂直接加在玻片上封片。分子探针公司提供的抗衰减剂对各种荧光探针的抗衰减作用见表 21-4。

表 21-4 抗衰减剂对不同荧光探针的抗衰减作用

荧光团	无抗衰减剂	SlowFade 抗衰减剂		SlowFade Light 抗衰减剂		ProLong 抗衰减剂	
	抗光漂白作用 *	抗光漂白作用 *	初始荧光强度	抗光漂白作用 *	初始荧光强度	抗光漂白作用 *	初始荧光强度
Alexa Fluor 488	++	++	++	++	+++	+++	+++
Alexa Fluor 532	++	+	+++	+	++	+++	+++
Alexa Fluor 546	+++	++	+++	+	+++	++	++
Alexa Fluor 568	++	+	+++	+	+	+++	+++
Alexa Fluor 594	++	++	+++	++	+++	+++	+++
Alexa Fluor 633	+++	+++	+	+++	+++	+++	++
Alexa Fluor 647	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Alexa Fluor 660	+	+	+++	+	+++	+++	+++
Alexa Fluor 680	+	+	++	+	++	+++	++
AMCA	++	+++	++	++	+++	ND	ND
BODIPY FL	+	+++	+	+	++	+	++
Cascade Blue	+	+++	++	+++	+++	ND	ND
Cy3	++	+++	+++	++	+++	+++	+++
DAPI	++	++	+	++	+	+++	++
Fluorescein	+	+++	++	+	++	+++	+++
Marina Blue	+	ND	ND	ND	ND	+++	+++
Oregon Green 488	+	+++	+	++	++	+++	+++
Oregon Green 514	++	+++	+	++	++	++	++
Propidium iodide	+	++	++	++	+	+++	+++
SYTOX Green	+	++	++	+	+	+++	+++
Tetramethylrhodamine	++	++	++	++	++	+++	+++
Texas Red	+	+	++	+	++	+++	+++
YOYO-1	++	++	+++	+++	+	+++	+++

* (+++): 荧光团对光漂白有很好的抵抗作用; (++) : 荧光团对光漂白有一定程度的抵抗作用; (+): 荧光团对光漂白没有或仅有极弱的抵抗作用。 (+++): 抗衰减剂引起初始荧光强度极少或没有降低; (++) : 抗衰减剂导致初始荧光强度一定程度的降低; (+): 抗衰减剂导致初始荧光强度显著降低。数据是根据毛细管中的荧光探针溶液测得。ND: 未确定。

第二十二章 荧光探针及其染色技术

理想荧光探针的标准是既能准确真实地测出所需检测的指标,又不影响细胞固有的状态,但在实际应用中很难满足以上要求:一是因为荧光探针的荧光性质会受到细胞内许多因素的影响;另外荧光探针的引入不可避免地会对检测体系的原有状态产生或多或少的影响。例如,抗体上标记荧光染料后,如果每个抗体上结合的荧光基团超过4个,一般就会降低抗体的亲和力。减少测量误差的总原则是:① 尽量应用最低浓度的荧光探针;② 尽量避免细胞损伤或副产物的生成;③ 使探针的分布限制在所感兴趣的部位;④ 采取措施克服细胞内环境对探针的影响。

第一节 荧光探针负载(染色)原则及注意事项

应根据不同的细胞类型,选择不同的染色方法。本节仅叙述活细胞采用的荧光探针的染色原则及注意事项。总的原则是进入胞内的荧光探针应限定在胞质内,而不在细胞器,如线粒体或核中聚集。荧光探针的浓度在保证一定信噪比的前提下应尽量采用低浓度,以尽可能消除对待测离子的缓冲作用。荧光探针负载入细胞内的方法有以下几种:① 细胞和荧光探针的酯化衍生物共同孵育法;② 微电极法(适用于带电荷的染料);③ 离子电渗法;④ 把细胞悬液、荧光探针和能增强膜对低分子量物质通透性的化学试剂一起孵育。

两类因素可影响胞内荧光探针浓度及分布:一类是由细胞本身的因素,如细胞膜表面积、细胞内酯酶的含量及分布(可使酯化的荧光探针去酯化)等,这是影响染色的主要因素;第二类因素与具体的实验条件有关,如孵育时间、孵育温度、孵育混合物的搅拌程度,初始的荧光探针浓度及细胞浓度等都会影响染色的效果,应根据实验需要进行调整。一般来说,进行胞质离子浓度的动态监测时要求染色时间短(10~30 s)、温度高(>30 ℃)、荧光探针浓度低、细胞浓度高,这些因素综合在一起,决定了单个细胞所能吸收的荧光探针分子数的上限。如果要研究线粒体、细胞核和内质网等细胞器的离子浓度,就需要延长孵育时间(>60 s)、降低孵育温度(<30 ℃)、提高荧光探针浓度、降低细胞浓度。

温度对染色过程及荧光探针的分布有明显影响,尤其是对于组织样品和器官及肌肉块等致密结构。生理范围内的高温可提高酯酶的活性,使荧光探针在最先进入的区域(通常是胞质)或细胞(组织标本)中很快去酯化,从而限制了它的分布。降低孵育温度可明显降低酯酶活性,但对荧光探针的扩散又不利,荧光探针扩散到一定程度后要去酯化以阻止其进一步扩散。在低温(5 ℃~10 ℃)孵育一段时间后,要在较高温度下再孵育一段时间。这样可以避免去酯化不完全的荧光探针在细胞或细胞器中聚集,因为这会给 Ca^{2+} 浓度测定带来明显的误差。对于大块的多细胞结构(如肿瘤块和骨骼肌)和胞外酯酶活性很高的组织,要特别注意染色温度的控制。

对于大多数细胞类型,酯化型荧光探针负载相对容易,且使用方便,无必要寻求其他代替方法。酯化型荧光探针的缺点是细胞器所结合的荧光探针及未去酯化的荧光探针,往往对所测荧光信号有明显干扰,而且荧光探针也有可能与胞内位点结合,因此还应寻找更合适的染色方法,比如使用膜不透性的荧光探针。

有些方法,比如注射法和电渗法,需用很细的微电极刺穿靶细胞的胞膜,通过加压或电流使荧光探针进入胞质,电极尖端直径为1~2 μm 或更小,这个步骤必然会导致一定程度的细胞损伤,而且往往是

不可逆的。在处理多细胞组织时,还可能需要进行多次穿刺以使足够数量的细胞染上色。不过,使用电渗电极法染色可以准确地计算细胞内荧光探针的浓度,这就要求知道注入速率、注射时间及细胞体积。由于玻璃微电极的直径变化不一,所以需要用一个标准微电极把 fura-2 注入模拟胞质离子组成的液滴中,以校正电极的注入速率。液滴中 fura-2 的浓度可从 360 nm 的吸收光谱标准曲线中算出,这样,胞质中的 fura-2 的浓度也可算出,而且还可用公式表示通过电极的总电量与注入的 fura-2 的摩尔数之间的关系,根据细胞的体积(更准确地说是胞质的体积),就可算出胞质中荧光探针的摩尔浓度。

电生理学家通常用膜片钳微电极记录通过电极向细胞内注入荧光探针时的总电流,这种方法可以精细地研究许多种细胞中的离子电流和离子流动,但膜片钳微电极的插入会明显影响胞质的体积,从而会干扰离子浓度的测定。也可以用化学试剂来提高膜对小分子量物质(如阳离子敏感荧光探针)的通透性。这类方法的共同之处在于可使细胞(或组织)与相应的化学试剂共同孵育,从而提高膜的通透性,如低 pH 溶液或高 ATP 溶液。曾有报道用除垢剂洋地黄皂苷可促进植物细胞对荧光探针的吸收:胡萝卜体细胞胚胎只用 fluo-3/AM 孵育或在酸性条件或有扩散剂 pluronic F-127 存在时,用 fluo-3/AM 孵育几乎看不到明显的荧光,但如在含 fluo-3/AM 的介质中加入 0.025%~0.1% 的洋地黄皂苷,就能在胚胎细胞的胞质中观察到明显的荧光,重要的是,这种处理不会干扰细胞的正常发育,说明对细胞膜的损伤很轻或只是暂时的。

通过暂时去除二价离子,使细胞外膜泄漏,也可将小分子量物质导入细胞,有人采用此法把光蛋白 aequorin 引入平滑肌细胞及组织,该法适合于把去酯化的 Ca^{2+} 敏感荧光探针负载入组织标本。

第二节 常用的染色方法

一、酯化荧光探针染色法

将钙荧光探针酯化后形成的乙酸羟甲基酯(简称 AM),为不带电荷的亲脂性化合物,易于透过质膜进入胞质内,在胞质内被非特异酯酶水解释放出游离酸形式的荧光探针分子,其不易漏出胞外,从而发挥其钙探针的作用。此法对细胞生理过程干扰较小,简便易行,因此成为钙测定时常用的方法。该方法主要步骤简述如下:

1. 贮存液的配制

(1) 酯化荧光探针贮存液的配制:将酯化荧光探针用无水二甲基亚砜(DMSO)配成 1~10 mmol/L 贮存液,按一次实验用量分装后, -20℃ 贮藏。但因为酯化荧光探针贮存液在 1~4 周后易水解,因此在用量不大的情况下,最好购买厂家已分装好的小包装产品,每个小包装供一次实验用。

(2) Pluronic F-127 贮存液的配制:用 DMSO 配成 20% (w/v) 贮存液,可加热至 40℃ 并保持 20 min 以利溶解。配好后室温贮藏,勿冷藏,因冷藏可能使 Pluronic F-127 结晶析出。

2. 染色 用无血清、无酚红培养液稀释贮存液,一般荧光探针的最终浓度为 1~10 $\mu\text{mol/L}$ (注意使 DMSO 的最终浓度 $\leq 0.1\%$), 20℃~37℃ 下孵育细胞约 30 min (根据需要可在 10~120 min), 染色温度为 37℃ 时能缩短染色所需时间,室温下染色则可减轻荧光探针渗入细胞器的副作用;然后用不含荧光探针的培养液洗脱,再在 37℃ 下保持 30 min,以促使进入胞内的酯化探针充分水解。若单用酯化荧光探针不成功,则可加入非离子性表面活性剂 Pluronic F-127,终浓度为 0.01%~0.1%;也可小幅度慢速振荡,均有助于染色。酯化荧光探针染色法可使胞内荧光探针浓度达到 30~150 $\mu\text{mol/L}$ 。

二、显微注射法

显微镜注射法是通过显微注射方式将荧光探针的游离酸或钾盐注入细胞内,与酯化荧光探针染色法相比,该方法的优点是既可防止荧光探针漏出胞外,又可防止荧光探针与胞内蛋白质结合或进入细胞

器,还可避免未充分水解酯化荧光探针的残留荧光,从而消除非特异荧光的干扰。显微注射法常用的有以下几种方式:

1. **膜片钳技术** 利用膜片钳技术的全细胞方式将荧光探针导入。玻璃微电极由无芯玻璃管制成,阻抗为 3~5 MΩ。电极内液所含荧光探针浓度为 30~100 μmol/L。在微操纵器控制下使微电极与细胞膜形成 10 GΩ 以上的紧密连接(高阻封接),用负压或电压脉冲穿透质膜,形成全细胞记录方式,保持 5 min 后,电极内液与细胞内液达到平衡,使胞内获得相同浓度的荧光探针。本方法的优点是胞内荧光探针浓度较精确,还可同时监测 $[Ca^{2+}]_i$ 和细胞电活动。

2. **微量电泳法** 钙荧光探针为阴离子,可用微量电泳法导入胞内。用有芯玻管制成微电极,阻抗为 10~20 MΩ,尖端直径为 0.5~1 μm。利用虹吸作用将少量 1 mmol/L 钙荧光探针(1~2 mm 液柱)导入电极尖端,再从电极尾端注入 10 mmol/L KCl 液,Ag-AgCl 电极接阴极,参考电极接阳极。在微操纵器控制下将微电极刺入胞内,用 0.5~2 nA 直流电通电 20~60 s。

3. **压力注射法** 玻璃微电极制作和细胞穿刺法同上,利用微量注射器注入约为细胞容积 1%,浓度为 3~10 mmol/L 的钙荧光探针。

三、透膜剂法

利用透膜剂使细胞膜通透性增强时,培养液应与细胞内液相同(含 KCl 120~145 mmol/L)。培养液中加入钙荧光探针和增强膜通透性的药物,如去垢剂 digitonin (洋地黄皂苷) 10 μg/ml 或 saponin (皂角素) 45 μg/ml,细菌毒素穿孔剂 α-toxin (葡萄球菌毒素) 20~50 μg/ml 或 Streptolysin (链球菌溶血素 O) 0.1~1 μg/ml。其他用于增强膜通透性的方法尚有“渗透压休克法”(用低渗培养液)、“酸性负载法”(降低培养液 pH 值)、无钙液、钙螯合剂 EGTA、EDTA、ATP 及电穿孔法。由于这些方法均对细胞有一定损害,故已不用于单细胞钙成像实验,仅偶尔用于细胞悬液的 $[Ca^{2+}]_i$ 测量。

第三节 常用荧光探针的染色方法

一、BCECF 测定 pH 值

1. **储存液配制** BCECF-AM 溶于 DMSO 配成 1 mmol/L 溶液,等份分装后, -20℃ 避光保存。

2. 染色步骤

- (1) 将培养细胞用 PBS (含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 洗 2 遍;
- (2) 加入 BCECF-AM (终浓度 1~5 μmol/L), 37℃ 孵育 30~60 min;
- (3) 用 PBS (含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 洗 2 遍;
- (4) Bio-Rad MRC-1024 激光扫描共聚焦显微镜观察。

二、SNARF-1 定量比率测定 pH 值

1. **储存液配制** SNARF 溶于 DMSO 配成 1 mmol/L 溶液,等份分装后, -20℃ 避光保存。

2. 染色步骤

- (1) 将培养细胞用 PBS (含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 洗 2 遍;
- (2) 加入 SNARF-1-AM (终浓度 1~5 μmol/L), 37℃ 孵育 30~60 min;
- (3) 用 PBS (含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 洗 2 遍;
- (4) Bio-Rad MRC-1024 激光扫描共聚焦显微镜观察。

三、Indo-1 测定细胞内 Ca^{2+}

1. **储存液配制** Indo-1 (分子量为 840), 活细胞标记常选用 Indo-1 AM, 分子量为 1010、呈干粉

状, 将其溶于 DMSO 配成 1 mmol/L 溶液, 等份分装后, 避光冷藏保存。

2. 染色步骤

- (1) 将培养细胞用 PBS (含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 洗 2 遍;
- (2) 加入 Indo-1 AM (终浓度 1~5 $\mu\text{mol/L}$), 37℃ 孵育 30~60 min;
- (3) 用 PBS (含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 洗 2 遍;
- (4) Bio-Rad MRC-1024 激光扫描共聚焦显微镜观察。

也可用弱的去垢剂 Pluronic F-127 助染。可将 Pluronic F-127 溶于 DMSO 配成 20% (W/V) 的溶液, 终浓度为 1%~2%。

四、Fluo-3 测定细胞内 Ca^{2+}

1. 储存液配制 Fluo-3 (分子量为 855), 活细胞标记常选用 Fluo-3 AM, 分子量为 1130、呈橙色粉状, 避光冷藏保存或将其溶于 DMSO 配成 1 mmol 溶液, 等份分装后, 避光冷藏。

2. 染色步骤

- (1) 将培养细胞用 PBS (含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 洗 2 遍;
- (2) 加入 Fluo-3 AM (终浓度 1~5 $\mu\text{mol/L}$), 37℃ 孵育 30~60 min;
- (3) 用 PBS (含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 洗 2 遍;
- (4) 激光扫描共聚焦显微镜观察。

可用 Pluronic F-127 助染, 方法同上。

五、CFDA 测定细胞间通讯

1. 储存液配制 CFDA 即 5- (6) -羧基荧光黄乙酰乙酸盐 [5- (and-6) -carboxyfluorescein diacetate, 5 (6) -CFDA], 分子量为 460.40, 用乙醇或 DMSO 配成 10 mg/ml 溶液, 等份分装后, 避光冷藏。

2. 染色步骤

- (1) 将培养细胞用 PBS (含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 洗 2 遍;
- (2) 加入 CFDA 溶液 (终浓度 10~20 $\mu\text{g/ml}$), 37℃ 孵育 10~15 min;
- (3) 用 PBS (含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 洗 2 遍;
- (4) 激光扫描共聚焦显微镜观察。

六、DiBAC₄ 测定细胞膜电位

染色步骤

- (1) 激光扫描共聚焦显微镜观察, 实验中注意将细胞内外的 DiBAC₄ 浓度保持一致。如果细胞去极化, 如增加溶液的 KCl 浓度 10~15 $\mu\text{mol/L}$, DiBAC₄ 荧光强度增强;
- (2) 培养细胞用 DiBAC₄ 孵育, 37℃, 10~20 min, 终浓度 2~5 $\mu\text{mol/L}$ 。

七、Rhodamine 123 标记活细胞线粒体

染色步骤

- (1) 培养细胞用 PBS (含 Ca^{2+} 、 Mg^{2+}) 洗 2 遍;
- (2) 加入 Rhodamine 123 溶液 (终浓度 1 $\mu\text{g/ml}$), 37℃ 孵育 10~30 min;
- (3) 用 PBS 冲洗 2 遍;
- (4) 激光扫描共聚焦显微镜观察。

八、AO 显示 RNA 和 DNA

染色步骤

- (1) 培养细胞用 95%酒精固定 10~15 min, 干燥;
- (2) 1%醋酸酸化 30 s;
- (3) 0.01%AO 染色 5~10 min;
- (4) PBS (pH 4.8) 洗 1 min;
- (5) 0.1 mol/L CaCl_2 分化 30 s 或用水洗数分钟;
- (6) 激光扫描共聚焦显微镜观察。

九、PI 显示 DNA

染色步骤:

- (1) 培养细胞用 PBS 洗 2 遍, 离心;
- (2) 弃上清液留 0.5 ml, 用 PBS 将细胞密度调整为 $1 \times 10^6/\text{ml}$;
- (3) 加入浓度为 5 mg/50 ml 的 RNAase 0.5 ml, 37 °C 孵育 30 min;
- (4) 取出放入冰浴中, 加入浓度为 5 mg/100 ml 的 PI 1.5 ml, 染色至少 30 min;
- (5) 300 目尼龙网过滤;
- (6) 共聚焦显微镜观察。

第四节 荧光探针的校正

由于荧光探针进入细胞后表现出不同于在胞外时的性质, 所以应对胞内荧光探针进行校正。影响荧光探针在胞内性质的主要因素有粘度、荧光探针的相互粘合等。能直接测量荧光探针细胞内荧光的方法最有可能在实验条件下对离子变化进行精确测量, 这些方法要求有特定离子的缓冲体系和离子载体, 以使胞内外的离子库保持平衡。Ionomycin 是一种对钙特异性很强的离子载体, 经常被用于平衡钙库, 但其运输钙的能力对 pH 有很强的依赖性, 因而要求有较高的介质 pH 值, 但这许多实验往往是行不通的。对 pH 不敏感的离子载体有 A23187 及其溴化物 Br-A23187, 前者与 fura-2 组合时有明显的背底荧光, 它适合和可见光激发的荧光探针 (如 fluo-3/AM、rhod-2 和 fura red) 配合使用; 而后者适合与紫外光激发的荧光探针 (如 fura-2 和 indo-1) 配合应用。

不同的荧光探针校正方法不同, Bakker 等用一种新方法进行体内 fura-2 的校正。他们将哺乳动物骨骼肌纤维保存在液状石蜡中, 实验前浸泡在 Ca^{2+} 缓冲液中, 其中游离钙浓度已知, Mg^{2+} 、 K^+ 、 H^+ 及有机阴离子的浓度与标本中大致相同。用螯剂 EGTA 和 BAPTA 来缓冲 Ca^{2+} , 使用 BAPTA 是因为其在生理 pH 范围内对 pH 变化不敏感。把 Ca^{2+} 缓冲液的小液滴连同 fura-2 游离酸及皂角素一起直接注入肌纤维束, 皂角素能增加肌细胞膜的通透性, 有利于胞质与介质之间的平衡。纤维束浸在试验液中一直平衡到纤维束发出稳定的单色荧光 (通常需 15 min)。即使在 Ca^{2+} 浓度很高、纤维束极度收缩时, 液状石蜡也能防止 fura-2 从纤维束中漏出。用 350 nm 和 380 nm 光激发后测量相应的荧光, 用最小二乘法拟合, 得到 350 nm/380 nm 的荧光比值与 Ca^{2+} 浓度的关系曲线。用体内法测得的 fura-2 的 K_d 值与在相同的 Ca^{2+} 缓冲液中用体外法所测结果相同。但是在肌纤维中, fura-2 校正公式中的常数比体外法的数值要低, R_{\max} 和 R_{\min} 都有所下降, 下降的幅度与前所述及的平滑肌细胞相近, 这说明, 在校正过程中, 选用最准确的常数是重要的。如果这种方法无法使用, 还可以使用体外校正法, 体外校正法可以测量荧光探针复合物的解离常数和校正参数。

第二十三章 常用荧光探针

第一节 测定细胞活性的荧光探针

荧光方法为细胞活性和细胞增殖提供了准确、重复性很好的检测手段，广泛应用于发酵技术和药物筛选等。荧光活性分析常常可以代替动物毒性试验，而且比比色法（锥虫蓝排除法）灵敏、比 ^{51}Cr 释放法更安全。荧光方法根据活细胞的代谢过程（酶活性或膜电位）来选择相应的荧光探针，采用不能透过细胞膜的核探针来识别死细胞或膜不完整的细胞。有许多探针可用于评价活细胞的功能，分子探针公司就提供有多种成套试剂盒。

一、细胞活性和细胞毒性试剂盒

许多化学和生物学试剂可刺激和控制细胞的活性、细胞增殖和许多重要的活细胞功能：包括凋亡、细胞粘附、化学趋向性、多药抗性、入胞作用和信号转导；同时这些过程也可引起细胞内自由基、游离离子浓度和膜电位的改变，通过相应的荧光探针即可检测到这些变化。细胞活性和毒性检测方法主要是用于计算群体中活细胞和死细胞的比例，相反，增殖检测方法主要用于测定细胞群体的生长速率或检测生长细胞群体中的子代细胞。基于荧光的细胞活性和增殖检测方法通常比放射性核素更安全、花费更小，比比色法更敏感，比动物实验法更方便。与 ^{51}Cr 释放方法不同，用于测定细胞介导的细胞毒作用的荧光测定法不需要大样本。另外，荧光测定法比台盼蓝排除法更方便。这种常用的确定细胞活性的比色法必须在3~5 min内完成，因为在加入染料后，蓝染细胞的数量随时间延长而增加。由于细胞类型的多样性及其所处环境的不同，因此要设计一种对于所有细胞类型都适用的检测细胞活性的方法是不可能的。分子探针公司 LIVE/DEAD 细胞活性检测试剂盒给研究人员提供了适合细菌、真菌和更高级的真核细胞测定细胞活性/细胞毒性的方法，常用的试剂盒见表 23-1。

表 23-1 适合特定的微生物和革兰染色细胞活性检测试剂盒和细菌计数试剂盒

产品号	试剂盒名称	试剂盒成分	应用范围	原理
L-3224	LIVE/DEAD 细胞活性/细胞毒性检测试剂盒	1. 钙黄绿素 AM 2. Ethidium homodimer-1 3. 详细操作步骤	显微镜检查，微孔板测量，流式细胞术	钙黄绿素 AM 进入细胞后被活细胞内的酯酶水解产生胞质内绿色荧光，而不能透过细胞膜的 ethidium homodimer-1 标记膜损伤细胞的核酸产生红色荧光。
L-7013	LIVE/DEAD Reduced Biohazard Cell Viability Kit #1	1. SYTO 10 核酸染料 2. DEAD Red 核酸染料 3. 详细操作步骤	显微镜检查，流式细胞术	可透过细胞膜的 SYTO 10 染料标记活细胞的核酸产生绿色荧光，而不能透过细胞膜的 DEAD Red 染料标记膜损伤细胞的核酸产生红色荧光。随后的固定可灭活病原体但不影响染色结果。
L-23101	LIVE/DEAD Reduced Biohazard Cell Viability Kit #2	1. 绿色荧光反应染料 2. 二甲基亚砷 3. 详细操作步骤	流式细胞术	活细胞仅在其表面与绿色荧光反应染料反应，细胞呈现较弱的荧光。而膜损伤的细胞则整个细胞都着色，产生明亮的荧光。随后的固定可灭活病原体但不影响染色结果。

续表 23-1

产品号	试剂盒名称	试剂盒成分	应用范围	原理
L-23102	LIVE/DEAD Reduced Biohazard Cell Viability Kit #3	1. 红色荧光反应染料 2. 二甲基亚砷 3. 详细操作步骤	流式细胞术	活细胞仅在其表面与红色荧光反应染料反应, 细胞呈现较弱的荧光。而膜损伤的细胞则整个细胞都着色, 产生明亮的荧光。随后的固定可灭活病原体但不影响染色结果。
L-23105	LIVE/DEAD Reduced Biohazard Cell Viability Kit #4	1. 蓝色荧光反应染料 2. 二甲基亚砷 3. 详细操作步骤	流式细胞术	活细胞仅在其表面与蓝色荧光反应染料反应, 细胞呈现较弱的荧光。而膜损伤的细胞则整个细胞都着色, 产生明亮的荧光。随后的固定可灭活病原体但不影响染色结果。
L-7010	LIVE/DEAD 细胞介导的细胞毒性检测试剂盒	1. DiOC ₁₈ (3) 2. Propidium iodide 3. 详细操作步骤	显微镜检查, 流式细胞术	靶细胞与绿色荧光膜染料 DiOC ₁₈ (3) 预孵育, 而后与含有红色荧光膜不透染料 propidium iodide 的效应细胞混合。活的和死的靶细胞染成绿色, 为膜着色。膜损伤的靶细胞和效应细胞呈现红色核酸染色, 活的效应细胞无荧光。
L-7011	LIVE/DEAD 精子活性检测试剂盒	1. SYBR 14 核酸染料 2. Propidium iodide 3. 详细操作步骤	显微镜检查, 流式细胞术	膜通透性核酸染料 SYBR 14 标记活精子呈现绿色荧光, 膜不透性的 propidium iodide 标记膜损伤精子呈现红色荧光。
L-7009	LIVE/DEAD 酵母菌活性检测试剂盒	1. FUN 1 2. Calcofluor White M2R 3. 详细操作步骤	显微镜检查, 微孔板	真菌细胞膜的完整性和代谢功能是将细胞内 FUN 1 的黄绿色荧光转化为空泡内结构的橘红色荧光所必需的; Calcofluor White M2R 标记细胞壁的几丁质呈现蓝色荧光, 与细胞代谢状态无关。
L-7012 L-7007 L-13152	LIVE/DEAD BacLight 细菌活性检测试剂盒	1. SYTO 9 核酸染料 2. Propidium iodide 3. BacLight 封片油 4. 详细操作步骤	显微镜检查, 微孔板测量, 流式细胞术	膜通透性核酸染料 SYTO 9 将活细菌标记上绿色荧光; 膜不透性 propidium iodide 将膜损伤细菌标记上红色荧光。试剂盒 L-7007, 染料是两种染料的混合物; 而试剂盒 L-7012, 染液是互相分开的; 试剂盒 L-13152, 染料以干粉形式放置于一对聚乙烯管中。
V-7023	ViaGram Red+ 细菌革兰染色和活性检测试剂盒	1. DAPI 2. SYTOX Green 核酸染料 3. Texas Red-X 交联的麦胚凝集素 (WGA) 4. 碳酸氢钠 5. BacLight 封片油 6. 详细操作步骤	显微镜检查,	膜通透性的 DAPI 将活细菌标记为蓝色; 膜不透性的 SYTOX Green 将膜损伤细菌标记为绿色; 同时 Texas Red-X WGA 将革兰阳性细菌表面标记为红色。
L-7005	LIVE BacLight 细菌革兰染色试剂盒	1. SYTO 9 核酸染料 2. Hexidium iodide 3. BacLight mounting oil 4. 详细操作步骤	显微镜检查, 微孔板测量, 流式细胞术	当革兰阳性和革兰阴性细菌同时用膜通透性染料 SYTO 9 和 hexidium iodide 染色时, 革兰阴性菌为绿色, 革兰阳性菌为红色。
B-7277	细菌计数试剂盒	1. SYTO BC 细菌染液 2. 微球标准悬液 3. 详细操作步骤	流式细胞术	膜通透性的 SYTO BC 染料将革兰阳性和阴性细菌都标记为绿色荧光; 校准的聚苯乙烯微球悬液作为悬液分析的体积标准。

这些试剂盒中, LIVE/DEAD 细胞活性/细胞毒性检测试剂盒相对较常用, 该试剂盒包含有两种探针: ①钙黄绿素/AM (C-1430、C-3099、C-3100), 它是一种具有潜荧光的底物, 它只能在活细胞内被酶解, 形成不透过细胞膜的发绿色荧光的产物; 钙黄绿素对 pH 值不敏感, 比 BCECF 更易于为细胞所保留, 荧光也更强, 因而在 pH 值低于 6.5 时就成为首选的探针。对于那些膜翻转很快或胞内间隔中 pH 很低的细胞, 像癌细胞、生长活跃细胞和活化的白细胞, 钙黄绿素都是很好的活体探针。②乙啶同型二聚体-1 (E-1169) 是一种高亲和力的发红色荧光的 DNA 探针, 它只能通过死细胞的受损细胞膜。这两种探针的荧光发射峰重叠很小, 荧光信号强, 胞外本底荧光弱。用这种试剂盒的优点是: 方法简单, 不需洗涤, 在室温下即可操作, 两个探针可同时加入, 操作可一步完成, 而且结果定量可靠。用这种方法还可以评价细胞介导的细胞毒性, 以及合成物、自然物和许多影响细胞完整性的环境和遗传因子的毒性。

这些试剂盒提供的试剂操作步骤简单, 可同时对活细胞和死细胞进行双色标记和评估。因为仅根据单一的生理学或形态学指标不容易判断细胞的活性, 因此还应与其他的检测方法配合应用, 如酶活性的检测、膜通透性检测、氧化-还原能力检测。每种检测方法都有其固有的优点和局限性, 都会给实验结果带来一定的偏差, 因此应根据实验目的不同选择不同的检测方法。分子探针公司还有一些进行增殖活性检测的试剂盒, 可快速检测粘附或非粘附细胞的数量, 这种方法主要是根据存在新复制的 DNA、总核酸或总蛋白含量进行测定的。在生命科学研究中, 对动物细胞计数和细胞增殖进行定量的试剂是一种非常有价值的研究和诊断工具, 当前还没有一种荧光试剂能在细胞分裂时特异性地掺入细胞, 并在单细胞基础上进行直接检测, 所以大多数评价细胞增殖的方法是靠 ^3H 胸腺嘧啶核苷或 5-溴-2'-脱氧尿苷 (BrdU) 掺入法测定。在 BrdU 标记实验中, 几种核酸染料和 ChromaTide 核苷酸证明是有价值的。分子探针公司 CyQUANT 细胞增殖检测试剂盒使用 CyQUANT GR 试剂可测定细胞增殖过程中核酸含量的变化, 而细菌计数试剂盒则提供了样品细菌计数的简单方法。具体内容可参考分子探针公司的试剂目录, 也可通过下述网址进行查询: <http://www.probes.com>。

细胞凋亡的研究中, 荧光探针有着重要作用。与细胞凋亡相关的试剂, 包括根据细胞的通透性选择性检测凋亡细胞的专门试剂和某些磷脂酰丝氨酸结合蛋白的交联物, 分子探针公司都可提供。可通过上述网址进行查询相关信息, 在此不再赘述。

检测细胞活性和检测活细胞功能的荧光探针之间显然存在明显的交叉, 如产生荧光的酯酶底物通常被用来检测细胞活性和增殖情况, 还可用来检测细胞粘附、凋亡和多药抗性。同样地, 膜通透性和膜非通透性核酸染料也广泛应用于活细胞功能的检测。

二、活细胞探针

大多数评价细胞活性的荧光探针是那些在健康细胞中才有酶活性的酶的底物或者是一些只有活细胞才能摄取的荧光探针 (表 23-2)。

(一) 酯酶底物

有些探针以电中性或近中性的形式被动跨膜后, 经胞内酯酶作用, 转化成极性的荧光产物而被具有完整质膜的细胞所保留; 死细胞或垂死细胞的细胞膜已损伤, 即使仍保留有酯酶活性, 酯酶产物也会很快泄漏, 低温和带高净电荷的酯酶产物有助于细胞保留探针。发荧光的酯酶产物沿膜破损处从细胞中泄漏出来, 定量测量泄漏物即可测定抗体、NK 细胞、药物和去污剂等介导的细胞毒作用。有些细胞, 包括肥大细胞和上皮细胞, 可活跃地分泌极性产物。

BCECF AM 曾经一直是测量细胞毒作用, 特别是 NK 细胞介导的细胞毒作用的标准探针。但是, BCECF 的荧光对 pH 值很敏感, 其荧光强度在 pH 7.0 时 (其 $\text{pK}_a=6.98$) 仅为其最大荧光强度的一半, 而且在细胞的酸性区域中会更低。钙黄绿素 (C-481) 比 BCECF AM 性能更佳, 除了不能进行胞内 pH 值测量, 在所有应用中, 都可取代 BCECF AM。钙黄绿素是钙黄绿素 AM 的水解产物, 是极性的荧光衍

生物, 经常被用于脂质体和细胞融合的研究中。和 BCECF 相比, 它更易于为活细胞所保留, 在很多种哺乳动物细胞中, 其荧光强度可高达前者的 2.5 倍。常用活细胞常用荧光探针见表 23-2。

表 23-2 检测细胞活性的荧光探针

荧光探针 (产品编号)	发射光	特异性	备 注
calcein blue, AM (C-1429)	蓝	酯酶	易染, $T_{1/2} < 15 \text{ min}$
Carboxy calcein blue, AM (C-1431)	蓝	酯酶	易染, $T_{1/2} < 60 \text{ min}$
Hoechst 33258, pentahydrate (bis-benzimide) (H-1398), Hoechst33342, trihydrochloride, trihydrate (H-1399)	蓝	DNA	检测染色体异常
荧光黄 * 参考标准 * (F-1300)	绿	酯酶	易染, $T_{1/2} < 10 \text{ min}$ (37 °C)
5 (6) -CFDA * 混合异构体 * (C-195), 5-CFDA * 单异构体 * (C-1361)	绿	酯酶	$T_{1/2} < 30 \text{ min}$ (37 °C), pH 敏感
5-CFDA-AM (C-1354)	绿	酯酶	$T_{1/2} < 30 \text{ min}$ (37 °C), 比 C-195 易染
H ₂ DCFDA (D-399)	绿	过氧化酶/酯酶	氧化, pH 不敏感, 滞留性差
SFDA (S-1129)	绿	酯酶	比 C-195 更难染
carboxy-DCFDA (C-369)	黄绿	酯酶	pH 敏感性比 C-195 差
BCECF-AM (B-1150), BCECF-AM (B-3051)	黄绿	酯酶	易染, $T_{1/2} = 60 \text{ min}$ (37 °C), pH 敏感
钙黄绿素, AM (C-1430), C-3099	黄绿	酯酶	易染, $T_{1/2} < 180 \text{ min}$ (37 °C), pH 不太敏感
罗丹明 123 (R-302)	黄绿	线粒体	电位驱动
二氢罗丹明 123 (D-632)	黄绿	过氧化酶/线粒体	氧化, 电位驱动
吖啶橙 (A-1301)	绿/橙	DNA/RNA/溶酶体	在酸性细胞器中聚集
四甲基罗丹明乙酯高氯酸盐 (TMRE) (T-669)	橙	线粒体	电位驱动
Dihydropyranosamine (D-638)	橙	过氧化酶/线粒体	氧化, 电位驱动
二氢乙啶 (hydroethidine) (D-1168)	红	过氧化酶及 DNA	氧化, 染核
Carboxynaphthaflorescein (C-654)	红	酯酶	pH 敏感

(二) 过氧化物酶底物

通过评价细胞的氧化能力, 也可以测量细胞活性。例如, 二氢罗丹明 123 (DHR123, D-632) 在呼吸过程中可被活的中性白细胞氧化成罗丹明 123, 而且还可以使活植物细胞染色; 二氢四甲基 rosamine (DHTM Ros, D-638) 的功能与此相似, 可以和罗丹明滤光片一起使用; 二氢乙啶 (D-1168) 也是一种还原态荧光体, 它在染色细胞的胞质中呈蓝色荧光。很多活细胞可将二氢乙啶氧化成乙啶, 而乙啶是 DNA 探针, 插入 DNA 后发红色荧光。

(三) 测定活细胞中巯基和谷胱甘肽的探针

巯基在细胞生物学中有重要功能, 它在细胞增殖、细胞运输、DNA 合成和细胞运动等方面都有重要作用, 特别是大多数哺乳动物细胞中都含有高达 10 mmol/L 的重要的非蛋白质巯基。谷胱甘肽中的巯基, 可保护细胞免受自由基、氧化剂和亲电试剂的损伤。谷胱甘肽在实体瘤中的分布极不均匀, 谷胱甘肽和谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 在耐药性方面可能也有一定作用。有证据表明, 谷胱甘肽的水平与艾滋病病人的病程有关。由于活细胞内谷胱甘肽的水平很高而又多变, 因此在底物饱和的条件下 GST 的动态测量非常困难。而且 GST 的同工酶不论是量还是活性, 都变化不一, 使分析更加复杂。此外, 用于测量谷胱

甘肽的荧光试剂,除了与谷胱甘肽的巯基反应外,还会与细胞内其他巯基,包括蛋白质的巯基反应,所以,在考虑这些试剂能否用于定量测量细胞中的谷胱甘肽 GST 时要特别小心。由于其反应产物可以保留很长时间,所以这些能和谷胱甘肽反应的探针有些也可用作长期的荧光示踪剂。

1. Monochlorobimane Monochlorobimane (mBCl) (M-1381) 的分子式是 $C_{10}H_{11}ClN_2O_2$, 分子量为 226.66, CAS 编号为 76421-73-3。mBCl 是定量测定细胞谷胱甘肽水平和 GST 活性的选择性探针。M-1381 比 Monobromobimane (M-1378) 更特异地和完整细胞中的谷胱甘肽反应,而成为流式细胞术中测定耐药性的有用试剂。而且,高压液相色谱的分析表明:谷胱甘肽是肝细胞中唯一和 M-1381 反应的低分子量巯基化合物,用 M-1381 测量谷胱甘肽的结果与用谷胱甘肽还原酶所测结果相当。在谷胱甘肽耗尽的细胞中, M-1381 可能会与蛋白质反应,这一点要引起注意。

2. 测定巯基的荧光探针 5-氯甲基荧光黄二乙酸盐 [CellTracker Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate) (C-2925) 和 5-氯甲基曙红二乙酸盐 (CMEDA) C-2926] 也是测定巯基的探针, C-2925 分子式为 $C_{25}H_{17}ClO_7$, 分子量为 464.86, CAS 编号为 136832-63-8。其酶解产物可用氩离子激光器激发,因而在测量胞内谷胱甘肽水平方面,比常用的 M-1381 用途更大,CMFDA 的酶解产物的吸收和发射光的量子效率也比 M-1381 高。但有一些因素可能使其结果的分析复杂化:这些探针对于谷胱甘肽的特异性还有待于阐明,而且,这些探针只有经酯酶作用后才产生荧光。

CMFDA 和 CMEDA 都是无色、无荧光的膜通透性探针。像钙黄绿素和 BCECF AM 一样,染色时通常把它们加到细胞培养的介质或缓冲液中,浓度为 $1\sim 10\mu\text{mol/L}$ 。像 M-1378 一样,CMFDA 和 CMEDA 也自由地扩散到细胞中,被胞液中的酯酶切去乙酸根,所释放的产物有明亮的荧光。在分步反应中,可认为是 GST 催化了氯甲基和胞内巯基的反应,这一反应在体外是可以发生的。结合了巯基的产物被细胞俘获,而过量的未和巯基反应的试剂则扩散到细胞外的介质中。没有 GST 时,CMFDA 和 CMEDA 几乎不和巯基反应,所以用流式细胞仪测定单细胞中 GST 和巯基(包括谷胱甘肽)的浓度时是很好的底物。但要注意,不是所有的荧光都源于酶解作用,氯甲基衍生物和胞内蛋白质的作用也可能产生荧光。用 CMFDA 所测得的细胞巯基的水平可作为细胞周期的函数,CMEDA 的荧光比 CMFDA 的荧光要弱,但它对胞内 pH 值变化不敏感。

(四) 离子泵荧光探针

活细胞都有离子泵和离子通道,以使细胞内离子的浓度及膜电位维持在合适的水平。一旦细胞死亡,其离子泵和离子通道也随之消失,导致细胞内外离子浓度相等,膜电位也降为零。这种伴随细胞死亡而导致的泵活性的丧失可用多种探针进行评价,如电位敏感性探针和钙指示剂,例如,电位敏感性探针罗丹明 123 可对活细胞的线粒体选择性染色。

细胞的质子泵也可维持其酸性有机体内的低 pH 值。由于吖啶橙 (AO, A-1301) 和中性红 (N-3246) 在酸性有机体内的富集取决于 pH 值,因而也可用于评价细胞活性。吖啶橙呈弱碱性,可在哺乳动物细胞的溶酶体、植物液泡和含胰岛素的分泌颗粒等酸性细胞器中浓集。当 AO 在溶酶体中富集时,可发出很强的橙色荧光。很多细胞毒分析中都已采用中性红这种溶酶体探针,中性红 645 nm 的红色荧光可在活细胞内用荧光计数器测量,如用 488 nm 单色光激发中性红和 BCECF AM 的荧光可同时测量,因此中性红可以成为多色流式细胞术测定细胞活性的有用探针。

随着细胞的死亡、离子泵活性和离子通道完整性的丧失,胞内自由钙离子浓度增加,因而用 Ca^{2+} 指示剂如 fura-2 AM (F-1201) 也可评价细胞活性。

三、死细胞探针

那些透膜能力特别低的荧光探针只能使死细胞或膜受损细胞染色。虽然任何不透过细胞的染料都可能用作死细胞探针,但最常用的还是那些不透过细胞的 DNA 荧光探针。表 23-3 列出的是常用的测量死细胞的探针。

表 23-3 常用的死细胞探针

探针 (产品编号)	荧光颜色	特异性
丹磺酰赖氨酸 (D-372)	蓝	膜完整性
溴化乙锭 (EB, E-1305)	红	DNA
碘化丙锭 (P-1304)	红	DNA
乙锭同型二聚体-1 (E-1169)	红	DNA
乙锭单叠氮化物 (E-1374)	红	DNA

(一) 膜非通透性 DNA 探针

这些探针常用以评价哺乳动物细胞的电融合介导的损伤、测量分离的胰岛小岛的活性、检测细胞凋亡、对 ATP 引起细胞膜完整性的变化进行评估。溴化乙锭由于其膜通透性略大, 其检测结果的可靠性稍差; 乙锭同型二聚体-1 对 DNA 的亲合力高, 比溴化乙锭强 1 000 倍, 结合后的荧光强度也高 40 倍, 胞内滞留性好, 因而应用更为普遍。

PI、EB 和乙锭同型二聚体-1 都可用氩离子激光器激发, 因此可用于流式细胞术分选死细胞, 而且, 它们的 Stokes 位移大, 可以和异硫氰酸荧光素 (FITC) 一起用于双色流式细胞术。用罗丹明滤光片时, PI-DNA 结合物的荧光要强些。PI 和 EB 的发射峰与荧光黄探针的发射峰有部分重叠, 对于用 BCECF AM 作活体探针的双色流式细胞术而言, PI 比 EB 更好, 因为 PI 与 BCECF 的光谱重叠较少。

一些较新的 DNA 探针如 PO-PRO、BO-PRO、YO-PRO 和 TO-PRO 都有优越的光谱学性质, 它们的消光系数比碘化丙锭至少大 10 倍, 而且未和核酸结合时基本上没有荧光, 这些探针不能透过活细胞膜, 可使死细胞染上明亮荧光。YO-PRO-1 和 TO-PRO-1 可用氩离子激光器激发, 用于流式细胞术和共聚焦成像的细胞活性测定。经 TO-PRO-3 (T-3605) 染色后的 DNA, 最大吸收波长为 642 nm ($\epsilon_{642}=102\ 000\ \text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 最大发射波长为 661 nm, 波长 514 nm ($\epsilon_{514}=1\ 800\ \text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的氩激光只能很弱地将其激发, 而波长 633 nm ($\epsilon_{633}=87\ 200\ \text{cm}^{-1}\cdot\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的氦-氖激光却能很强地将其激发, 这使 TO-PRO-3 成为有用的活体探针, 对 DNA 倍体的测定也有潜在的应用价值。如果和荧光黄及藻红素配合使用, 还可用于多色流式细胞术。

T-3605 即 TO-PRO-3 iodide (642/661), 分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{31}\text{I}_2\text{N}_3\text{S}$, 分子量为 671.42, CAS 编号 157199-63-8。乙锭单叠氮化物 (单叠氮乙锭, E-1374) 是一种非透膜性探针, 它能共价标记死细胞的 DNA。先将它和死细胞和活细胞的混合物一起孵育, 在紫外灯照射下会产生活泼的中间体, 它只能透过死细胞的细胞膜而与其中的 DNA 共价结合, 可用来检测单克隆抗体对人类前列腺癌细胞的细胞溶解作用。洗涤后固定细胞, 再用显微镜、荧光板读数仪、流式细胞仪等进行观察。E-1374 即 ethidium monoazide bromide (EMA), 分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{BrN}_5$, 分子量为 420.31, CAS 编号 58880-05-0。

(二) 丹磺酰赖氨酸

丹磺酰赖氨酸为非透膜性探针, 已被用于识别死细胞, 包括热致死细胞。流式细胞术研究表明, 经丹磺酰赖氨酸染色的细胞没有活性, 这种可用紫外光源激发的探针和罗丹明或荧光黄等波长更长的探针配合使用可以用于多色分析。

第二节 膜荧光探针

膜探针主要用于生物膜结构以及脂质转运和代谢动力学的研究, 在膜生化研究中亦具有广阔的应用前景。在结构上, 膜探针与磷脂等膜成分相似, 能插入在磷脂膜中。在生物膜的研究中, 人们广泛采用人工膜模型, 因为这样可减少影响因素, 使问题简化, 并可对膜的成分进行人工控制和调节。常用的人

工膜模型有脂质体, 表面单层膜 (L-B 膜) 和固定双层膜 (supported bilayers) 等。

一、膜脂的特点和膜探针的应用

(一) 膜脂的结构特点和分类

膜上各种脂分子均具有亲水的极性头部和疏水的非极性尾部, 形成双亲性分子。膜脂中以磷脂类为主, 约占脂质总量的 70% 以上, 其次是胆固醇, 一般低于 30%, 并含有糖脂, 还有少量属鞘脂类的脂质。磷脂的基本结构是: 一分子甘油的两个羟基同两分子脂酸相结合, 另一个羟基则与一分子磷酸结合, 后者再同一个碱基结合, 根据这个碱基的不同, 动物细胞膜中的磷脂主要有四种: 磷脂酰胆碱 (PC)、磷脂酰乙醇胺 (PE)、磷脂酰丝氨酸 (PS) 和磷脂酰肌醇。鞘脂类的基本结构和磷脂类似, 但不含甘油, 鞘脂类的脂质以鞘氨酸为骨架的鞘磷脂, 称神经鞘脂 (SM)。胆固醇结构很特殊, 它含有一个甾体结构 (环戊烷多氢菲) 和一个 8 碳支链。

(二) 膜脂的特性

膜脂的特性集中表现在两个方面, 即膜脂的不对称性和膜脂的流动性。膜脂的不对称性即分布在膜两侧的各类脂的含量是不相同的, 不同细胞或同一细胞而所在部位不同的膜结构中, 脂质的成分和含量各有不同; 双分子层的内外两层所含的脂质也不尽相同, 例如, 靠外侧的一层主要含磷脂酰胆碱和含胆碱的鞘脂, 而靠胞浆侧的一层则有较多的磷脂酰乙醇胺和磷脂酰丝氨酸。膜脂的流动性是因为脂质的熔点较低, 这决定了膜中脂质分子在一般体温条件下是呈液态的, 即膜具有某种程度的流动性。脂质双分子层在热力学上的稳定性和它的流动性, 能够说明为什么细胞可以承受相当大的张力和外形改变而不致破裂, 而且即使膜结构有时发生一些较小的断裂, 也可以自动融合而修复, 仍保持连续的双分子层的形式。膜脂分子的运动方式主要有侧向扩散、旋转、伸缩振动、翻转、摆动等。

胆固醇含量在两层脂质中无大差别, 但它们含量的多少和膜的流动性大小有一定关系, 一般是胆固醇含量愈多, 流动性愈小。近年来发现, 膜结构中含量相当少的磷脂酰肌醇, 几乎全部分布在膜的靠胞浆侧, 这种脂质与细胞接受外界影响, 并把信息传递到细胞内的过程有关。运用荧光漂白恢复技术, 可研究膜脂的侧向扩散, 侧向扩散很快, 其扩散系数约为 $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$; 而膜脂的翻转运动是一个非常缓慢的过程, 一般需要几个小时, 可通过监测非辐射能量传递和用激发态分子荧光来分析翻转运动。

(三) 膜探针应用

膜融合是细胞摄入、分泌物转运和病毒感染等许多生命过程中的一个重要环节, 研究膜融合的方法有多种。膜融合会导致一种依赖亲和性的激发态过程的变化, 如非辐射能量传递、激发态二聚体的形成或荧光淬灭, 该作用可源于荧光基团的单纯稀释或膜融合介导的某种反应底物的引入。膜融合的检测可用于监测融合体中膜脂质或水分的混合情况。

膜探针越来越多地被用于研究细胞内和细胞间的脂质转移以及脂质的生物合成和降解, 尤其是磷脂酶对脂质的降解。这些过程不仅确定了脂质的代谢途径, 而且在细胞信号传导中起重要作用。磷脂转移可能是自发的或由蛋白质介导, 带短脂肪链的磷脂在水相更易溶解, 因而利于磷脂的直接转移。自发的或载体介导的脂质转移可用荧光显微镜直接进行观测或间接地采用与检测膜融合相同的方法来进行检测。

二、膜流动性测定的荧光探针

(一) 测量细胞膜侧向扩散的荧光探针

荧光漂白法荧光探针有以下三类: ① 疏水性或两亲性荧光发色团可非特异性地插入生物膜内, 如亲脂性荧光素, 包括各种氨基荧光素 (HAF); dialkylcabocyanine, 包括 DiI C_{16} (3)、DiI C_{18} (3)、FAST DiO、FAST DiI。② 荧光标记的两亲性膜脂质分子, 如 nitro-benzoyxadiazol (NBD) 标记的磷脂及脂肪酸: NBD-PC、NBD-PE; 荧光素标记的磷脂: 荧光黄-PE。③ 荧光标记的蛋白或肽类常用荧光黄、曙红、罗丹明等荧光发色团共价连接于赖氨酸及蛋氨酸上, 如 NBD 及丹磺酰 (Dansyl) 标记短杆菌肽; 荧

光标记配体用于特异性地显示各种受体；荧光抗体标记膜抗原；荧光标记 Con A（伴刀豆凝集素）测量糖蛋白侧向扩散；荧光标记微管蛋白观察细胞骨架。

（二）测量膜旋转扩散的荧光探针

荧光偏振法荧光探针有以下几类：

1. **线性探针 (linear probes)** 吸收和发射偶极子与分子长轴呈共线性，围绕分子长轴的旋转无作用，而围绕垂直于分子长轴又彼此垂直的另两个轴旋转可引起消偏振。常用探针包括① DPH（二苯基己三烯，diphenylhexatriene）及其衍生物：包括 DPH、阳离子衍生物 TMA-DPH、阴离子衍生物 DPH-PA、CE-DPH、DPHpPC 及丙酸 DPH，为研究膜流动性最常用的荧光探针，插入双层脂膜后荧光增强 10 000 倍，而在水溶液中几乎无荧光，故背景荧光可忽略不计。TMA-DPH 疏水性较弱，染色较快且稳定。一般将 DPH 类溶于四氢呋喃以制作储存液，DPH 还可用乙腈、丙酮、DPHpPC、乙醇作溶剂制作储备液。② Parindric acid（姜饼树酸）：为天然高度不饱和脂肪酸，有顺式和反式两种构型，游离酸或甲酯均可使用，用乙醇作溶剂制作储备液。

2. **非线性探针** 其吸收和发射偶极子非共线性，与旋转轴也不重合，使荧光消偏振实验结果的解释较困难。常用探针包括：① 9-anthroyloxy 标记脂肪酸或磷脂，最常用者为 n-9AS、N-(9-anthroyloxy) 硬脂酸；② 蒽染料 (anthracene) 标记脂肪酸；③ 芘 (perylene) 标记脂肪酸，如 3-芘-月桂酸；④ 芘 (pyrene) 标记脂肪酸及一系列衍生物。

3. **其他荧光探针** 包括①曙红类 (HAE)，如 5-(N-hexadecanoyl)-aninocoeosin；②罗丹明类，如 octadecyl rhodamine B。

三、荧光基团标记的磷脂

由于磷脂本身就是膜的构成成分，将磷脂标记上一定的荧光基团就可成为磷脂的荧光探针。磷脂是细胞信号传递过程的主要介质，因此磷脂酶作用的代谢过程、脂质排序 (lipid sorting) 和运输 (trafficking) 已成为重要的研究领域。而在磷脂的研究实验中，常将荧光标记的磷脂嵌合于双层脂质体中，用带荧光标记的磷脂标记活细胞时，常用脂质体作为载体。按荧光基团结合的部位，可将荧光标记的磷脂分为两类：荧光基团标记在极性头部的磷脂（荧光基团标记在碱基上）和荧光基团标记在非极性尾部的磷脂（荧光基团标记在脂肪酸链上）。

（一）荧光基团标记在头部的磷脂

在这类磷脂中，荧光基团通过碱基末端的氨基与磷脂相连，这些荧光基团大多是极性的，如 BODIPY、荧光黄、罗丹明、得克萨斯红等。

1. **BODIPY 标记的磷脂** 在 BODIPY 标记的磷脂 D-3799 和 D-3800 中，荧光基团连在头部。D-3799 即 N-(4, 4-difluoro-5, 7-diphenyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-propionyl)-1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (BODIPY 530/550 DHPE)，分子式为 $C_{67}H_{106}BF_2N_4O_9P$ ，分子量为 1191.38；D-3800 即 N-(4, 4-difluoro-5, 7-dimethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-propionyl)-1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (BODIPY FL DHPE)，分子式为 $C_{57}H_{102}BF_2N_4O_9P$ ，分子量为 1067.23。它们与磷脂连接后，因其对周围环境不太敏感，BODIPY 的荧光性质不会有太大的变化。这些探针可研究膜表面分子识别反应，D-3800 可用于与抗 BODIPY 抗体结合。

2. **丹磺酰标记的磷脂** 丹磺酰基的荧光对溶剂的极性很敏感，它通过一个短脂肪酸链或直接与磷脂的氨基端相连。D-57 即 N-(5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl)-1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (dansyl DHPE)，分子式为： $C_{55}H_{100}N_3O_{10}PS$ ，分子量为 1026.44，CAS 编号 57093-06-8。这些探针可用于研究膜表面分子的反应，如磷脂依赖性 Ca^{2+} 结合蛋白激酶 C 和 Ca^{2+} 对膜脂质组成的直接作用。

3. 荧光黄标记的磷脂 荧光黄标记的磷脂酰乙醇胺即 N-(fluorescein-5-thiocarbamoyl)-1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (fluorescein DHPE) (荧光素-PE, F-362), 分子式为: $C_{64}H_{100}N_3O_{13}PS$, 分子量为 1182.54, CAS 编号 87706-98-7。它可用作细胞表面 pH 指示剂, 检测在脂质-水界面较大的单层中侧质子的传导, 监测细胞色素 C 跨囊泡的质子易位。抗荧光黄抗体 (A-889) 与 F-362 结合来研究膜表面特异性的识别反应, 由于荧光黄的光易变性, F-362 是使用荧光淬灭恢复的方法检测膜侧弥散的常用试剂。用抗荧光黄的胶体金标记物可显示 F-362 在支持双层膜中的侧弥散。

笼锁荧光黄-PE (D-3811) 即 N-(DMNB-caged fluorescein)-1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt, 分子式 $C_{82}H_{117}N_4O_{22}P$, 分子量为 1541.81, 它只被 UV 照射激发。

4. NBD 硝基苯二唑磷脂酰胆胺 (NBD-PE, N-360) 即 N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt, 分子式 $C_{49}H_{90}N_5O_{11}P$, 分子量为 956.25, CAS 编号 178119-00-1, 它是广泛使用的探针。特点如下: 浓度依赖性的荧光自身淬灭, 光稳定性低, 可作为罗丹明的能量供体, 其荧光强度中等, 摩尔消光系数也为中等水平。N-360 常用在 NBD 到罗丹明 (L-1392) 的能量转移实验以监测膜的融合。Struck, Hoekstra 和 Pagano 最先对此进行了报道, 已被扩展用于膜融合和膜间的脂质转移过程, NBD 荧光团连在头端抑制了囊泡间磷脂的转移。N-360 与罗丹明或得克萨斯红-PE (L-1392、T-647) 结合通过共振能量转移显微镜来显示脂质集团的空间关系, N-360 也有内源性膜成分如维生素 A 能量转移受体的功能。

氩激光激发的 N-360 也可用于膜侧融合的荧光淬灭恢复方法。N-360 在监测双层向六相的转换时尤其有价值, 因为转换可导致 N-360 荧光强度的增加。由于 N-360 在形成簇团时自身淬灭, 故可用于监测脂质的分离。NBD 荧光被 Ca^{2+} 淬灭可用来检测它在膜表面的定位及检测膜的通透性。

5. 芘磺酰胺 芘磺酰磷脂酰乙醇胺 (P-58) 即 N-(1-pyrenesulfonyl)-1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (PyS DHPE), 分子式为 $C_{59}H_{97}N_2O_{10}PS$, 分子量 1057.46, CAS 编号 76341-59-8。它以浓度依赖性的方式形成激发态的二聚体, 因此可作为研究膜表面现象的探针, 可用来双亲性荧光探针在磷脂单分子层的空气-水界面的二维扩散。P-58 也是监测膜融合的有效探针。

6. 罗丹明 常用的荧光素衍生物包括罗丹明磷脂酰乙醇胺 (T-1391) 和 L-1392、R-7712。T-1391 即 N-(6-tetramethylrhodaminethiocarbamoyl)-1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (TRITC DHPE), 分子式 $C_{68}H_{100}N_5O_{11}PS$, 分子量为 1236.68, CAS 编号 176181-90-1; L-1392 即 Lissamine rhodamine B 1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (rhodamine DHPE), 分子式 $C_{70}H_{117}N_4O_{14}PS_2$, 分子量为 1333.81, CAS 编号/名称 126111-99-7; R-7712 即 Rhodamine Red-X 1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (Rhodamine Red-X DHPE), 分子式 $C_{76}H_{128}N_5O_{15}PS_2$, 分子量为 1446.97。

它们在分离的脂质双层间不易转移, 它们是 BODIPY 和 NBD 磷脂和荧光素-PE (F-362) 的能量受体, 能量从荧光素标记的抗体转移到 L-1392 被用来检测支持双层中蛋白与二硝基苯脂质半抗原 (D-3798) 的结合。

7. 得克萨斯红 常用的得克萨斯红衍生物包括 T-1395 和 T-7710。T-1395 即 Texas Red 1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (Texas Red DHPE), 分子式为 $C_{74}H_{117}N_4O_{14}PS_2$, 分子量为 1381.85, CAS 编号 187099-99-6; T-7710 即 Texas Red-X1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (Texas Red-X DHPE), 分子式为 $C_{80}H_{128}N_5O_{15}PS_2$, 分子量为 1495.01。它们主要用做 NBD 和 BODIPY 和荧光黄的能量转移受体。得克萨斯红较长的发射波长可使能量转移显微镜较高地分辨供体和受体的发射信号, 此技术可显影脂质体与高

尔基体 ATP 依赖性融合。

8. 分子探针公司新开发的标记磷脂的探针 (M-12652、O-12650、D-7713)。M-12652 即 Marina Blue 1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (Marina Blue DHPE), 分子式 $C_{49}H_{80}F_2NO_{12}P$, 分子量为 944.14; O-12650 即 Oregon Green 488 1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (Oregon Green 488 DHPE), 分子式 $C_{58}H_{82}F_2NO_{14}P$, 分子量为 1086.25; D-7713 即伊红 (525/545)。

现将头部基团标记荧光探针的磷脂总结如下, 见表 23-4。

表 23-4 头部基团标记荧光探针的磷脂

标记物 (激发波长/发射波长) *	产品编号
丹磺酰 (Dansyl) (336/517)	D-57、D-3797
Pyrenesulfonyl (350/379)	P-58
Marina Blue (365/460)	M-12652
NBD (463/536)	N-360
Fluorescein (496/519) #	F-362
Oregon Green 488 (501/526) #	O-12650
BODIPY FL (505/511)	D-3800
BODIPY 530/550 (535/552)	D-3799
Eosin (525/545)	D-7713
Tetramethylrhodamine (540/566)	T-1391
LRB, Rhodamine Red-X (560/580)	L-1392、R-7712
Texas Red, Texas Red-X (582/601)	T-1395、T-7710

* 此处荧光的最大激发和发射波长 (nm) 是指在甲醇中测得, 并加入微量 KOH 作为指示剂, # 这些值在膜环境中可能不同。LRB: Lissamine rhodamine B. 注: 以上引自分子探针公司网上资料。

(二) 荧光基因标记尾部的磷脂

用于标记磷脂尾部的荧光基团有 BODIPY、联苯已三烯 (DPH)、硝基苯二唑 (NBD)、芘和芘等, 这些荧光基团结合后仍可保留原脂肪链的非极性特征。常用荧光探针包括:

1. BODIPY BODIPY 通过脂肪酸的烷基链与磷脂相连, BODIPY 是非极性的荧光团, 波长较长, 光谱性质比 NBD 好, 量子产率高达 0.9, BODIPY-PC 的荧光强度约为 NBD-PC 的 3 倍, 吸收峰也窄。它直接与脂肪酸的烷基链相连, 烷基链较短的 BODIPY-PC (D-3803、D-3805、D-3815) 更易掺入细胞。D-3803 即 2-(4, 4-difluoro-5, 7-dimethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-pentanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (BODIPY FL C_5 -HPC) 的分子式为 $C_{40}H_{67}BF_2N_3O_8P$, 分子量为 797.77; D-3805 即 2-(4, 4-difluoro-5, 7-dimethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-pentanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphate, diammonium salt (-BODIPY FL C_5 -HPA) 的分子式为 $C_{35}H_{62}BF_2N_4O_8P$, 分子量为 746.68; D-3815 即 2-(4, 4-difluoro-5, 7-diphenyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-pentanoyl)-1-hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (BODIPY 530/550 C_5 -HPC) 的分子式为 $C_{50}H_{71}BF_2N_3O_8P$, 分子量 921.91。芳香环上的取代基会影响其光谱, 取代基上的共轭双键越长, 其最大激发和发射波长越长, 由此可将 BODIPY 分成以下几种 (基团后括号内的数字分别表示其最大激发波长和发射波长): ①BODIPY (500/510) (D-3823、D-3824、D-3825、D-3826); 其主要结构区别如图 23-1 所示。②BODIPY FL (503/512) (D-3821、D-3822、D-3834、D-3862); ③BODIPY(530/550) (D-3832); ④BODIPY 558/568(D-3835); ⑤BODIPY(581/591)(D-3861)。

发绿色荧光的 BODIPY (500/510) 和 BODIPY FL (503/512) 可作为阳离子表面探针如 DiI (D-282) 和十八烷基罗丹明 B (O-246) 及波长更长的 BODIPY 探针的能量供体。BODIPY 的芳香环插进磷脂双层

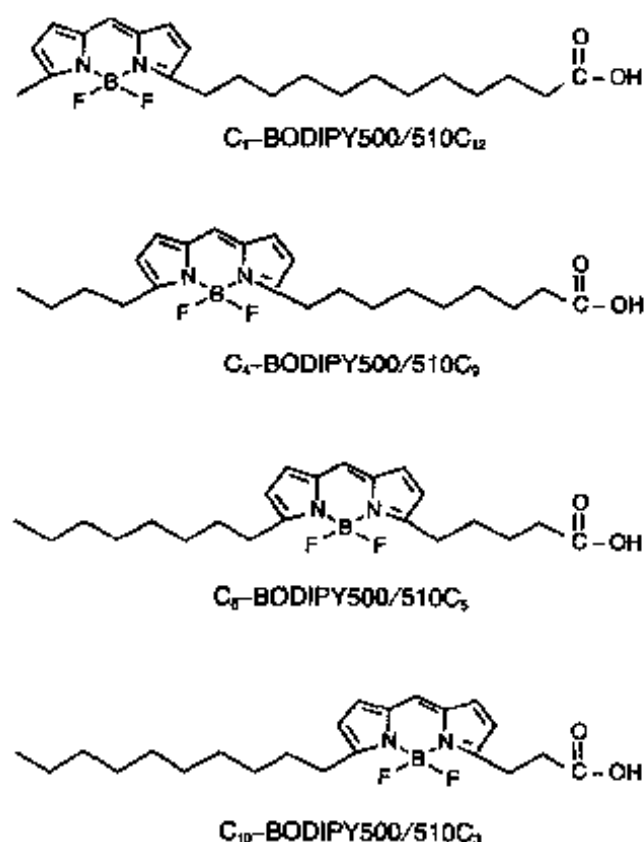


图 23-1 结构图显示同类的 BODIPY 500/510 脂肪酸 (D-3823, B-3824, D-3825, D-3826) 中荧光团相对于末端羧基的位置移动

可监测融合过程及脂质转移过程中 DPH 在膜中的分布, 用于研究乙醇诱导的交互对插的凝胶相、磷脂-胆固醇的相互反应、离子环境的作用, 在含有磷脂酰乙醇胺的混合脂质系统中由双层向六角型的相转变, 并可用来研究热致相转变。

3. NBD (460/534) NBD 浓度高时荧光淬灭, 光稳定性较低, 荧光量子效率中等, 消光系数中等。通过共振能量传递方式, 作为罗丹明的能量供体。硝基苯二唑标记的磷脂酰胆碱 (NBD-PC) 尤其适用于研究脂质运输的显影、光漂白的恢复 (FRAP) 和膜融合。NBD 己酰 PC (NBD C₆-HPC) 在膜间被动运输的速度比 NBD 十二酰 PC (N-3787) 快, N-3787 即 (NBD C₁₂-HPC), 分子式 C₄₂H₇₄N₃O₁₁P, 分子量为 856.05。NBD-PC 自身荧光淬灭能用于检查膜融合、相分离及其与脂质转移蛋白的结合, 还可检测磷脂酶 A₂ 的活性, 作为罗丹明的能量供体可监测脂质转移及其在微囊间和脂双层间的分布。从结构上分析, 标记在脂肪酸链上的 NBD 基团应分布在膜双层的尾部, 但荧光淬灭和 pH 滴定实验提示 NBD 基团折回到头部, 与标记在碱基部分的 NBD 的分布相似, 这就可以解释为什么 N-3786 的荧光对蛋白与膜表面的反应敏感。NBD 己酰鞘氨醇 (NBD C₆-sphingomyelin) (N-3524) 的分子式是 C₃₅H₆₁N₆O₉P, 分子量为 740.88, 它是神经鞘氨醇 (N-1154) 的代谢产物, N-1154 的分子式为 C₃₀H₄₉N₅O₆, 分子量为 575.75, CAS 编号为 86701-10-2。

N-3524 可监测细胞的内吞作用和鞘氨醇的胞内分布, 也可用于研究 Niemann-Pick 病, 一种常染色体隐性遗传的神经磷脂代谢障碍性疾病, 由于患者体内缺乏鞘磷脂酶, 造成神经鞘磷脂不能分解而蓄积在肝、脾和中枢神经系统内, 被单核巨噬细胞摄取的鞘磷脂也不能分解, 积聚于胞浆内形成泡沫状的 Niemann-Pick 细胞。

4. 芘 芘荧光团的荧光寿命很长, 在有机溶剂中, 没有取代基的芘母体的荧光寿命可达 100 ns, 高浓度时, 其激发态形成二聚体, 发射波长变长至 480 nm。由于它能在膜中富集而在膜中形成高浓度区, 根据其单体和激发态二聚体的发射波长的差异, 利用发射比例法可测量膜的侧向扩散速率。长激发态寿命使得荧光对氧淬灭敏感, 这样探针可用于检测氧在脂双层中的穿透。Lemmetyinen 和同事们研究了 H-361 在双层模型中的荧光衰变, 为静态和弥散控制的激发态分子的形成提供了力学模型。芘的激发态分子形成特点也适用于监测蛋白介导的和自发的磷脂转移过程。芘衍生物 1-hexadecanoyl-2-(1-pyrenedecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (β-py-C₁₀-HPC) (H-361) 的分子式为 C₅₀H₇₆NO₈P, 分子

的内部, 连接荧光基团和膜表面基团的烷基链越长, 其荧光双折射性越弱 (D-3795>D-3794>D-3793)。BODIPY 深藏在脂双层内部, 不易被抗体接近, 不能作为半抗原基团与抗体反应, 因而不能用于免疫荧光分析。由于荧光淬灭和非辐射能量传递, BODIPY-PC 的荧光量子产率和双折射性均随浓度而变化。

2. DPH DPH (D-202) 即 1, 6-diphenyl-1, 3, 5-hexatriene, 分子式为 C₁₈H₁₆, 分子量为 232.32, CAS 编号为 1720-32-7。DPH 通过脂肪酸链与磷脂相连, 其自身或其脂肪酸衍生物就是膜探针。DPH 和它的衍生物在水溶液中的背景荧光很弱, 可以忽略不计, 而且在膜中方向性好 (垂直于脂质双层表面), 当嵌进脂质双层时, 对磷脂定位顺序有敏感的荧光极化 (双折射性) 反应, 根据该性质, 用 D-476、T-204、D-202 可在大脂质体中进行磷脂顺序的空间图像分析。用 DPH-PC (D-476)

量为 850.13, 其 CAS 编号为 95864-17-8。用 H-361 进行的研究阐明了外源性的钙离子、血小板活化因子、甲醇和胆固醇对膜行为的影响。Langmuir-Blodgett 薄膜的特性也可用 H-361 进行显示, 包括细胞色素 C、Annexin、神经毒素、霍乱毒素、凝血酶原和 Ca^{2+} -ATP 酶在内的膜相关蛋白的作用已进行了研究。应用光分离技术, 研究者们使用含有 H-361 和 PE-结合的抗细胞表面抗原抗体的脂质体来选择性地杀伤 T 淋巴细胞。

5. 苝 苝的结构与性质和芘相似, 也形成激发态二聚体, 但是其有较长的吸收和发射波长、较短的激发态寿命和较高的荧光量子效率。苝衍生物 1-hexadecanoyl-2-(3-perylenedodecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (H-3790) 的分子式为: $\text{C}_{56}\text{H}_{82}\text{NO}_3\text{P}$, 分子量为 928.24, 它与 H-361 具有相似的性质。

6. 溴代脂酰磷脂 (B-3796) 在磷脂的两条脂肪酸链的中部各有两个溴原子, 它可用于淬灭位于脂双层的其他荧光探针的荧光。

常用的荧光基团标记酰基链的磷脂见表 23-5。

表 23-5 荧光标记酰基链 (尾部) 的磷脂

荧光团	激发/发射波长 *	磷脂: 产品编号
BODIPY	500/510	磷脂酰胆碱: D-3793、D-3795
BODIPY FL	503/512	磷脂酰胆碱: D-3792、D-3803、D-3771
BODIPY	530/550	磷脂酸: D-3805
BODIPY	581/591	磷脂酰乙醇胺: D-3813
DPH	362/433	磷脂酰胆碱: D-3806
NBD	460/534	磷脂酰胆碱: D-476
Perylene (苝)	440/450	磷脂酰胆碱: N-3786、N-3787
Pyrene (芘)	342/377	磷脂酰胆碱: II-3790
		磷脂酰胆碱: H-361、H-3818、B-3781、B-3782
		磷脂酰乙醇胺: H-3784
		磷酸甘油: H-3809
		磷酸甲醇 (Phosphomethanol): H-3810、O-7703

注: * 指甲醇溶液中的最大激发和发射波长, 在膜中的光谱可能不同, 次要发射峰值在 478 nm。

(三) 反应性磷脂

反应性磷脂上带有一些活性基团, 它们可通过共价键 (M-1617、M-1618、P-1619) 或共价键 (B-1550、B-1616、D-3798) 与其他分子相连。前者 (如 M-1617、M-1618 和 P-1619) 为琥珀酰亚胺基等基团所活化, 可结合到蛋白分子上, 将脂质体结合到抗体或其他蛋白, 因而可进行有目的的转运, 这些探针为酶、固体表面、毒素、电子密度显影剂和其他物质连到脂质体膜上提供了方法。吡啶二硫代 PE (P-1619) 即能直接与含有巯基的生物分子以双硫键联结, 也可先被 DTT (D-1532) 还原成自由巯基再与其他生物分子反应。含有马来酰亚胺的磷脂 (M-1617、M-1618) 可与含有巯基的生物分子形成稳固的交联; M-1618 即 (MMCC DHPE), 分子式为 $\text{C}_{55}\text{H}_{102}\text{N}_3\text{O}_{11}\text{P}$, 分子量为 1012.40; P-1619 即 (PDP DHPE), 分子式为 $\text{C}_{51}\text{H}_{96}\text{N}_3\text{O}_9\text{PS}_2$, 分子量为 990.43。

另一类反应性磷脂 (B-1550、B-1616) 含有生物素等基团, 可通过亲和素与膜及脂质体结合, 含有生物素-PE 的脂质体可用亲和素结合物进行分类。B-1550 即 N-(biotinoyl)-1, 2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (biotin DHPE), 分子式为 $\text{C}_{53}\text{H}_{103}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{PS}$, 分子量为 1019.45; B-1616 即 biotin-X DHPE, 分子式为 $\text{C}_{59}\text{H}_{114}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{PS}$, 分子量为 1132.61。新的 2, 4-二硝基苯标记的磷脂可研究细胞和分子的识别, 包括抗原的表面结合、细胞粘附的分子机制和受体介导的细胞内存过程。

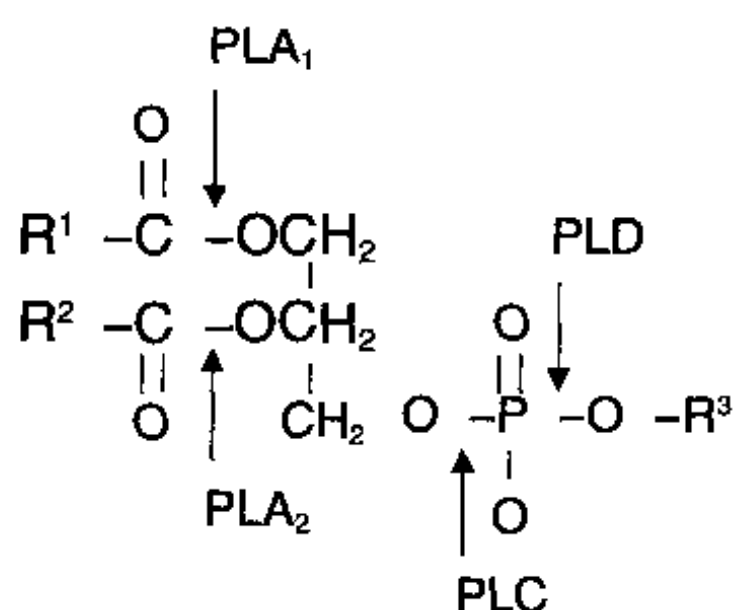


图 23-2 磷脂酶的分类及其裂解部位 PLA₁: 磷脂酶 A₁; PLA₂: 磷脂酶 A₂; PLC: 磷脂酶 C; PLD: 磷脂酶 D

(四) 磷脂酶底物

通过产生第二信使如二酰甘油、花生四烯酸盐、三磷酸肌醇 (IP₃) 起作用, 磷脂酶在细胞信号传递过程中起着重要作用, 根据对磷脂底物裂解的部位, 磷脂酶可分为四种, 即磷脂酶 A₁ 和磷脂酶 A₂, 磷脂酶 C 和磷脂酶 D, 见图 23-2。

研究磷脂酶活性的荧光方法分为两类: 一类是通过测量自身荧光淬灭或激发态分子形成过程中的荧光直接测定酶的活性; 还有一类是通过色谱法测定荧光产物。分子探针公司磷脂酶相关产品及其主要研究方法见表 23-6。

1. 磷脂酶 A₁ 和 A₂ 双苣基磷脂酶 A 荧光探针 (B-3781、B-3782), 它们的发射波长约为 470 nm, 提示探针的邻近两个苣荧光团形成激发态的二聚体。经磷脂酶水解后, 两个苣酰基被分开, 形成发射波长约 380 nm 的单体。

除作为磷脂酶 A 的底物监测磷脂酶 A₁ (PLA₁) 和 PLA₂ 的活性外, 还可用于研究蛋白激酶 C 与脂类的相互作用、DNA 和脂质体的结合以及脂类的动力学。B-3781 即 1, 2-bis-(1-pyrenebutanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine, 分子式为 C₄₈H₄₈NO₈P, 分子量为 797.88, CAS 编号 80115-55-5; B-3782 即 1, 2-bis-(1-pyrenedecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine, 分子式为 C₆₀H₇₂NO₈P, 分子量为 966.20; 双-BODIPY-甘油磷酸胆碱 (bis-BODIPY FL C₁₁-PC, B-7701) 是一种磷脂酶底物, 即 1, 2-bis-(4, 4-

表 23-6 磷脂酶的荧光研究方法

磷脂酶 *	探针	检测原理	检测方法	参考文献
A ₁ , A ₂	B-7701	分子内的自身淬灭	515 nm 处的荧光强度增加	1
A ₁ , A ₂	B-3781, B-3782	分子内的激发态分子形成	380/470 nm 发射比率	2~4
A ₁ , A ₂	B-3760, D-3761	游离巯基释放	产生荧光或产色的巯基反应物	5
A ₁ , A ₂	A-3880	游离脂肪酸传感器	432/505 nm 发射比率	6~8
A ₁ , A ₂	D-94 和 I-3881	蛋白质结合的荧光脂肪酸置换	500 nm 处荧光强度降低	9, 10
A ₂	N-3786, N-3787	分子间的自身淬灭	530 nm 处的荧光强度增加	11, 12
A ₂	H-361, H-3743 H-3810, H-3818	分子间的激发态分子形成	380/470 nm 发射比率	13~15
A ₂	O-7703	MeOH/H ₂ O-可溶的脂肪酸释放	荧光产物相分离 (Phase separation)	16, 17
A ₂ , C	H-7708	被三硝基苯基团分子内淬灭	荧光强度增加	18, 19
A ₂ , C, D	D-3771, D-7707	荧光性 O-烷基甘油衍生物形成	薄层色谱法 (TLC) 或高效液相色谱法 (HPLC)	20, 21
A ₂ , C, D	H-361, P-58	被二硫化多聚类脂基体 (disulfide-polymerized lipid matrix) 淬灭	380 nm 荧光强度增加	22, 23
C	M-2885	无荧光磷酸酯的水解	荧光产物	24
PI-C	B-7706, P-3764	低分子量荧光乙醇的释放	TLC 或 HPLC	25, 26

* 磷脂酶特性: A₁, A₂, C 或 D (见图 23-2); PI-C=磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C (仅限于细菌酶)。参考文献如下: 1. J Biol Chem 267, 21465 (1992); 2. Biochemistry 32, 583 (1993); 3. Anal Biochem 116, 553 (1981); 4. Biochim Biophys Acta 1192, 132 (1994); 5. J Biol Chem 259, 5734 (1984); 6. Anal Biochem 229, 256 (1995); 7. Biochem J 298, 23 (1994); 8. J Biol Chem 267, 23495 (1992); 9. Anal Biochem 212, 65 (1993); 10. Biochem J 266, 435 (1990); 11. Lipids 24, 691 (1989); 12. Biochem Biophys Res Comm 118, 894 (1984); 13. Biochim Biophys Acta 917, 411 (1987); 14. Chem Phys Lipids 53, 129 (1990); 15. Anal Biochem 177, 103 (1989); 16. Clin Chem 31, 714 (1985); 17. Biochemistry 32, 5373 (1993); 18. Chem Phys Lipids 59, 69 (1991); 19. Anal Biochem 170, 248 (1988); 20. Anal Biochem 218, 136 (1994); 21. Biochem J 307, 799 (1995); 22. Anal Biochem 221, 152 (1994); 23. J Biol Chem 270, 263 (1995); 24. Can J Biochem Cell Biol 63, 272 (1985); 25. Biochemistry 31, 12169 (1992); 26. Bioorg Med Chem Lett 1, 619 (1991)

difluoro-5, 7-dimethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-undecanoyl) -sn-glycero-3-phosphocholine (bis-BODIPY FL C₁₁-PC), 分子式为 C₅₂H₇₈B₂F₄N₅O₈P, 分子量为 1029.80。它是专门设计用于连续监测磷脂酶 A 作用的荧光探针, 其光谱与氩离子激光器激发光源相匹配。当这种探针掺入细胞膜后, 在 BODIPY FL 荧光团附近靠近磷脂酰基链的部位引起荧光自身淬灭。由于酰基链被磷脂酶 A₁ 或 A₂ 水解, 荧光团分离导致荧光强度增加。

PLA₂ 的活性也可用只带一个荧光团的探针检测, 如苾酰磷脂 (H-361、H-3743、H-3810) 和 NBD-酰磷脂 (N-3786、N-3787)。因为只有 sn-2 磷脂酰基链可被标记, 因此这些探针可区别磷脂酶 A₂ 和 A₁ 活性。在这种情况下要求有足够浓度的磷脂以发生荧光自身淬灭 (NBD-酰磷脂) 或能形成激发态分子 (苾酰磷脂)。H-361、N-3786、H-3787 的分子式、分子量、CAS 编号/名称、结构式见前。H-3810 即 1-hexadecanoyl-2-(1-pyrenedecanoyl) -sn-glycero-3-phosphomethanol, sodium salt (β-py-C10-HPM), 分子式为 C₄₆H₆₆NaO₈P, 分子量为 800.99。

在磷脂的 sn-1 位置用不可水解的醚连接的烷基链, 可得到研究 PLA₂ 和 PLA₁ 特异的荧光探针。1-Octacosanyl-2-(1-pyrenehexanoyl) -sn-glycero-3-phosphomethanol (C₂₈-O-PHPM; O-7703) 即是一种这样的底物, 可用于监测血清中的磷脂酶 A₂。O-7703 的分子式为 C₅₄H₈₈NO₇P, 分子量为 894.27, CAS 编号 96848-61-2。含有荧光团 1-O-烷基取代物磷脂也是研究磷脂酶 A₂ 特异性的色谱分析法 (chromatographic assays) 的有用底物, 包括含有 BODIPY FL 的磷脂 (D-3771、D-7707), 含有 NBD 的磷脂 (D-3768) 和含有丹酰基的磷脂 (D-3765)。分析过程是间接的, 需要通过色谱法从未酶解的底物中分离出带荧光脂质。D-3771 即 2-decanoyl-1-(O-(11-(4, 4-difluoro-5, 7-dimethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-3-propionyl) amino) undecyl) -sn-glycero-3-phosphocholine, 分子式为 C₄₃H₇₄BF₂N₄O₈P, 分子量为 854.86。

用硫代酰基化 (thioacyl substrate) 的底物 1-(S-decanoyl)-2-decanoyl-1-thio-sn-glycero-3-phosphocholine (D-3761) 可特异性地分析 PLA₁。在 PLA₁ 的作用下, 硫代酸酯键的水解可释放出一自由巯基, 可用分光光度法用二硫羟吡啶或 DTNB (D-8451) 等试剂检测, 也可用更为灵敏的巯基和硫化物定量测定试剂盒 (T-6060) 进行测定。DTNB 即 5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB; Ellman's reagent), 分子式 C₁₄H₈N₂O₆S₂, 分子量为 396.35, CAS 编号为: 69-78-3。

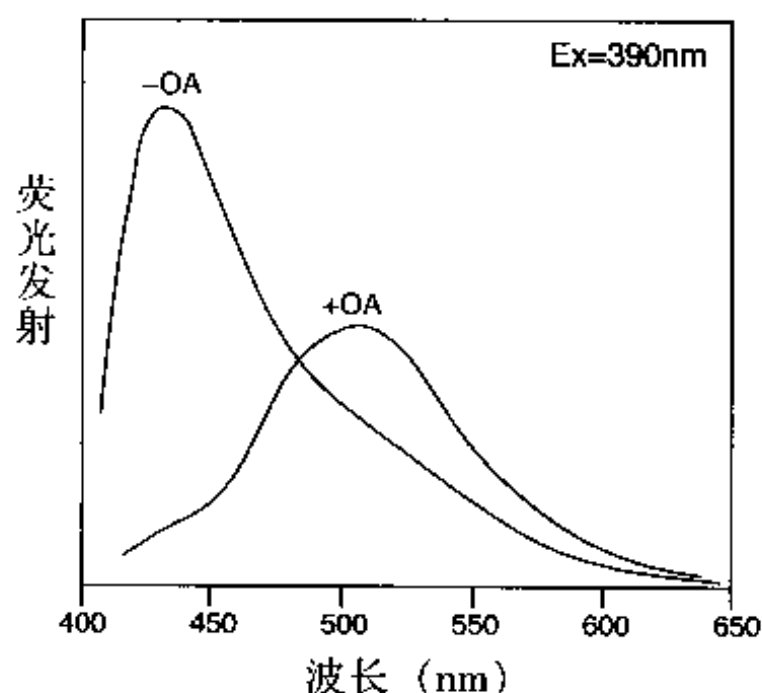


图 23-3 ADIFAB 游离脂肪酸依赖的光谱位移 (free fatty acid-dependent spectral shift) 该图表示在 pH 8.0 缓冲液中含有 (+OA) 和不含有 (-OA) 4.7 μmol/L 顺-9-十八烯酸 (油酸) (OA) 时 0.2 μmol/L ADIFAB 的光谱。在 505 nm 和 432 nm 的荧光发射比率可定量相当于游离脂肪酸的浓度

ADIFAB 脂肪酸荧光探针 (A-3880) 的功能是作为一种磷脂酶 A 裂解产物 (脂肪酸) 的荧光检测器 (图 23-3), 因此, 不仅不需要膜负载, 而且还能监测自然的 (而不是合成的) 底物的水解。用 ADIFAB 检测的溶血磷脂酶活性可与放射性核素方法得到的结果相当。Richieri 和 Kleinfeld 描述了一种用 ADIFAB 测定细胞和脂囊膜 (lipid-vesicle membranes) 磷脂酶 A₂ 活性的方法, 该方法能够检测水解速度达到 10⁻¹² mol/min。从脂肪酸结合蛋白 (I-3881) 用丹磺酰十一酸 (DAUDA, D-94) 取代是其他研究磷脂酶 A₂ 方法 (表 23-6) 的基础, 基本的检测原理与 ADIFAB 相似, 这一方法不需要用荧光标记的磷脂标记细胞。

2. 磷脂酶 C 和 D 磷脂酶 C 和 D 的荧光检测方法不如 PLA 酶那样完善。无荧光的 4-甲基香豆基磷脂酰胆碱 (4-methylumbelliferyl

phosphocholine) (M-2885) 可被磷脂酶 C 磷酸二酯酶裂解, 产生蓝色荧光的 7-羟-4-甲基香豆素 (H-189)。M-2885 的分子式为 $C_{15}H_{20}NO_6P$, 分子量为 341.30。4-甲羟香豆基磷脂酰胆碱也可被鞘磷脂酶 (sphingomyelinase) 水解, 其产物为神经酰胺 (N-脂酰鞘氨醇) 和磷脂酰胆碱, 因此也可用来检测鞘磷脂酶的活性。由于荧光团接近磷酸二酯键的酶解位点可能会阻碍底物的识别和结合, 但苾 (P-58) 和 NBD (N-360) 探针原则上应对磷脂酶 C 或 D 水解敏感。苾标记酰基链和三硝基苯 (TNP) 标记头部基团的磷脂可用来连续性监测磷脂酶 A_2 和磷脂酶 C 的活性, 酶解产物引起苾荧光强度增加。现在有商品化的 TNP β -py- C_6 -HPE (H-7708), 一种由 Kinnunen 及其合作者首先报道的 TNP 和苾标记的磷脂类似物, 它还可用来连续监测磷脂酶 D 的活性。1-苾丁基肌醇-1-磷酸 (P-3764) 是一种磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C 荧光底物, 酶水解后产生 1-苾丁醇 (P-244), 可用 TLC 或 HPLC 定量。BODIPY FL C_5 标记的肌醇-1-磷酸锂盐 (B-7706) 具有和 1-苾丁基肌醇-1-磷酸相似的特性, 可作为 PI-PLC 的底物, 其波长较长、吸光度高、荧光强度高, 因此非常适合氩离子激光作为光源的共聚焦显微镜研究。

高度纯化的仙影拳芽孢杆菌属 (*Bacillus cereus*) PI-PLC (P-6466) 可用来研究磷脂酰肌醇的合成和跨膜转运。PI-PLC 产生二酰甘油可用于 PKC 连接的信号转导研究。并可以在细胞保持活性的状态下, 提供一种 GPI-锚蛋白从细胞表面释放的方法。通过相应的单克隆抗体 (A-6400), 可用 Western blot 或酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测 *Bacillus cereus* 中 PI-PLC 活性, 也可用于活性酶的结构功能研究。磷脂酰肌醇的水解、GPI-关联的 PI-PLC 活性和乙酰胆碱酯酶的释放都可被抗体抑制。磷脂酶 A_2 、C 和 D 的荧光裂解产物 1-O-烷基-2-癸酰-*sn*-甘油-3-磷脂酰胆碱 (D-3771、D-3768、D-3765) 可根据它们在薄层色谱法 (TLC) 或高效液相色谱法 (HPLC) 中迁移程度的不同, 可进行分离和分别定量。波士顿大学的学者已经发现了溶血磷脂的生物合成掺入, BODIPY FL C_{11} -标记的 lyso PAF (D-3772), 是一种在中性白细胞原位产生酰化 BODIPY 磷脂的有效方法。使用这种方法, 他们已经确定磷脂酶 D 激活是中性白细胞对吞噬刺激进行反应时控制中性白细胞脱粒的关键步骤。D-3772 BODIPY FL C_{11} -lyso PAF, 分子式为 $C_{33}H_{56}BF_2N_4O_7P$, 分子量为 700.61。一种新的 2-十六碳三烯酰 BODIPY 磷脂 (D-7707) 被设计为色谱标准 (chromatographic standard), 用于生物合成掺入产物的检测。

(五) 血小板激活因子 (PAF) 衍生物

血小板激活因子 (PAF) 是醚键磷脂 (如 1-O-酰 2-乙酰-*sn*-甘油-3-磷脂酰胆碱), 有广泛的生物活性, 在血液凝固、血压调控、白细胞激活、受精卵子宫种植、变态反应和炎症等过程中有重要作用。在 *sn*-1 链末端掺入丹酸、NBD 和 BODIPY FL 等荧光基因, 得到一些荧光探针, 用 NBD 和 BODIPY PAF 类似物可分析 PAF 活性和代谢。

(六) 脂类探针的光谱特点

某些脂类探针的光谱特点总结为表 23-7。

表 23-7 一些脂类探针的光谱性质

光谱性质	苾 (Pyrene)	DPH	NBD	BODIPY FL
激发/发射波长 (nm) *	340/376	360/430	470/530	507/513
QY (τ)	0.6 (>100 ns)	0.8 (4~8 ns)	0.32 (5~10 ns)	0.9 (6 ns)
浓度依赖性	在高浓度约 470 nm 处形成激发态分子发射	高浓度发生自身淬灭	高浓度发生自身淬灭	在高浓度约 620 nm 处形成激发态分子发射
环境敏感性	对氧淬灭非常敏感, 在水中基本无荧光	在水中基本无荧光	在水中基本无荧光	相对不敏感。在水性和脂类环境都有强荧光

* 膜插入探针标准的荧光最大激发和发射波长; QY: 荧光量子产出率; τ : 荧光衰减寿命 (decay lifetime); 列出的数值为膜插入探针的标准的数值, 这些数值可能存在显著的环境依赖性差异 (见环境敏感性)。

四、阴离子膜探针

大多数阴离子膜探针,其荧光基团标记在脂肪酸(FA)的烷基上,许多这样的脂肪酸类似物也可掺入磷脂中。脂肪酸是许多生物活性分子的基本成分,某些脂肪酸(如花生四烯酸)在细胞信号传递中起着重要作用,磷脂酶A或其他脂肪酶水解磷脂后可释放出脂肪酸。荧光脂肪酸经常与对应的磷脂可互换地用作膜探针,然而,脂肪酸更容易在水相和脂相间进行转换。脂肪酸在水中的 pK_a 为5,呈离子状态,但在膜中其 pK_a 大约为7,因此,膜结合的脂肪酸中的绝大部分是中性的。某些荧光脂肪酸很容易被活细胞代谢变为磷脂、甘油二酯和甘油三酯、胆固醇酯和其他的脂类衍生物,用荧光指示剂ADIFAB(A-3880)可测定游离脂肪酸的浓度。其他的阴离子膜探针包括荧光黄酰胺和萘磺酸盐,荧光黄酰胺(或伊红)有一个酰氨基链附着在所羧苯基取代物的第5位上,此链可使阴离子荧光团定位在膜表面;萘磺酸盐由一完整的非极性的荧光团组成,此荧光团带有水化程度很强的(在水溶液中)阴离子取代基,可使探针定位在膜脂质与水的界面。这些探针在结构上与内源性的膜成分十分不同,与非特异性的蛋白结合探针在功能上一样。

(一) 荧光脂肪酸探针

大多数荧光脂肪酸类似物的荧光团连接在脂肪酸链内,最常见的是与末端(ω)碳原子(离羧基端最近)相连。尽管荧光脂肪酸有时可直接用作膜和脂质体的探针,但它们最常见的应用是合成荧光磷脂和被活细胞代谢掺入。根据标记荧光团的不同,常用的荧光脂肪酸探针包括标记BODIPY的荧光脂肪酸、标记nitrobenzoxadiazole(NBD)的荧光脂肪酸、苝标记的荧光脂肪酸、花标记的荧光脂肪酸、9-anthroyloxy标记的荧光脂肪酸和丹磺酰荧光团标记的荧光脂肪酸以及天然的荧光多不饱和脂肪酸、顺-十八碳四烯酸。

1. BODIPY 脂肪酸 BODIPY 脂肪酸是由BODIPYD荧光团在不同位置插入脂肪酸尾部,给线状结构加上了大约五个亚甲基基团的等价物形成的,它与长波长荧光探针不同的是缺乏离子电荷,因此导致其在膜中荧光团定位的唯一性。BODIPY衍生物消光系数(extinction coefficient)大于 $90\,000\text{ cm}^2\text{mol}^{-1}$,最大光吸收在500nm以上。目前常用的BODIPY脂肪酸和近似的最大吸收/发射波长(nm)如下:①BODIPY 503/512 (BODIPY FL、D-3821、D-3822、D-3834、D-3862);②BODIPY 500/510 (D-3823、B-3824、D-3825、D-3826);③BODIPY 530/550 (D-3832);④BODIPY 558/568 (D-3835);⑤BODIPY 581/591 (D-3861);

上述探针的分子式、分子量、CAS编号/名称和结构式如前所述。其中前八种BODIPY脂肪酸类似物与其他只是大致平行定位的类似物不同的是D-3827即4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-8-nonanoic acid (BODIPY (r) 493/503 C_{29}),分子式 $C_{22}H_{31}BF_2N_2O_2$,分子量为404.31。从结构式可以看出荧光团的长轴垂直地附在烷基链轴上。D-3829为阴离子去污剂SDS,而不是脂肪酸的BODIPY类似物,这些荧光基团可进一步标记各种脂肪酸。上述各种BODIPY荧光团,其商品名的数字指明了其最大的吸收和发射波长。目前膜探讨的光谱范围从起初的BODIPY 500/510脂肪酸到BODIPY 581/591类似物D-3860和D-3861。

绿色荧光BODIPY 500/510和BODIPY FL (503/512)脂肪酸一般有相似的光学特点,最长吸收波长带强且窄,荧光Stokes位移小,光谱重叠大,在磷脂双层中其光谱基本不变。这些探针较高的荧光量子产率为环境非依赖性的(典型为0.9),它们在局部高浓度时会自身淬灭,在稀释的水溶液中,量子产率不明显减小,脂肪酸与膜的相互作用不能在荧光强度改变的基础上检测出。荧光双折射性显示,B-3824的脂质/水分配系数大,尤其是液体相脂质。

BODIPY脂肪酸也可作为膜探针,长波长的BODIPY脂肪酸可作为绿色荧光BODIPY脂肪酸和磷脂酸胆碱能量传递的受体,像NBD-罗丹明一样,这种探针组合也可用于脂质转移和膜融合的研究。长波长BODIPY类似物易聚集在水介质中(较低临界分子团浓度),长波长的BODIPY脂肪酸比短波长衍生物

有较大的光学稳定性, BODIPY 磷脂类似物的光学特性与相应的游离脂肪酸的相似。

2. ANTHROYLOXY 脂肪酸 主要是十八烷基 (C_{18})、十六烷基 (C_{16})、十二烷基 (C_{12}) 和十一烷基 (C_{11}) 脂肪酸的 *n*-(9-anthroyloxy) 酯, 用许多荧光淬灭和能量传递的方法可显示。脂肪酸类似物中的 anthroate 荧光团在膜中定位的深度由其沿烷基链的位置确定, 与多数这样的探针一样, anthroyloxy-FA 探针 (除 A-39 外) 易分布在液态脂质相中。anthroyloxy 脂肪酸的吸收和发射光谱不受探针结构的影响, 但荧光寿命还是有些变化。

蕙丙酸 (A-176) 不含 anthroyloxy-FA 中的酯键, 其发射光谱受结构影响。anthroyloxy 荧光团的一个不寻常的光学特点为其激发光谱对周围粘度 (而不是极性) 敏感, 这是因为其激发态构象弛豫的结果。Anthroyloxy-FA 可用来鉴定膜中横向流动梯度, 在生理应用方面, 这些探针与二苯己三烯 (D-202) 一起使用作为膜流动性指示剂。anthroate 荧光团的双折射性较低, 且随激发波长而变化, 尽管如此, “膜流动性”所指的定量比在这些实验中所检测到的更具有普遍意义。鉴定膜流动性的另一种可替换的方法是用 A-39 和 A-92。A-39 即 16-(9-anthroyloxy)palmitic acid (16-AP), 分子式为 $C_{31}H_{40}O_4$, 分子量为 476.65, CAS 编号 64821-29-0; A-176 即 9-anthracenepropionic acid, 分子式为 $C_{17}H_{14}O_2$, 分子量为 250.30, CAS 编号 41034-83-7; A-40 即 12-(9-anthroyloxy)oleic acid (12-AO), 分子式为 $C_{33}H_{42}O_4$, 分子量为 502.69, CAS 编号/名称 73024-99-4; A-37 即 2-(9-anthroyloxy)stearic acid (2-AS), 分子式为 $C_{33}H_{44}O_4$, 分子量为 504.71, CAS 编号 78447-89-9; A-172 即 9-(9-anthroyloxy)stearic acid (9-AS), 分子式为 $C_{33}H_{44}O_4$, 分子量为 504.71, CAS 编号 69243-44-3; A-242 即 6-(9-anthroyloxy)stearic acid (6-AS), 分子式为 $C_{33}H_{44}O_4$, 分子量为 504.71, CAS 编号 67708-95-6。

Anthroyloxy 脂肪酸已用于许多与膜和与膜反应相关分子的研究中 (表 23-8), 这些探针尤其适用于跟踪通过水相并由脂肪酸结合蛋白介导的囊间转移, 通过荧光能量传递来检测蛋白色氨酸残基在膜蛋白的空间定位, 以及通过 anthroyloxy 脂肪酸二分子光二聚体形成检测转移弥散率。由于光二聚体形成是无荧光的, 这些探针连续或高能量的激发在多数用途中是不容许的。Anthroyloxy 脂肪酸可通过生物合成掺入泡状口炎病毒 G 和人白血病髓样细胞中。

表 23-8 anthroyloxy 脂肪酸的应用

应用	举例
膜和蛋白结构	(1) 通过荧光能量传递测得的色氨酸蛋白残基相对于脂双层的空间定位 (2) 膜与胆固醇、多粘菌素 B、氯丙嗪、地塞米松、麻醉剂、大麻、DDT、钙、表面活性剂、血红蛋白、维生素 E 和辅酶 Q 的相互作用
膜和蛋白动力学	(1) 膜的横向流动梯度 (2) 膜流动指示剂, 常用于生理学 (3) 光二聚体形成检测的转移弥散率 (4) 脂质转移、融合和代谢 (5) 结合到脂肪酸结合蛋白和囊间转移
分析应用	脂质过氧化

3. NBD 和丹酰脂肪酸 三种 NBD 脂肪酸与广泛使用的 N-3786 和 N-3787 有相似的光谱特点。这些探针的应用, 如荧光淬灭恢复检测方法和脂质转移的研究都与它们的磷脂对应物相似。NBD 荧光团的荧光量是高度溶剂依赖性的, 这些探针在水介质中基本无荧光, 但掺入脂双层后则产生足够强的荧光, 荧光光谱范围较大, 最大值为 530nm。N-质子化 NBD 脂肪酸 (N-316、N-678) 的荧光量子产率比 N-甲基类似物如 M-93 和 M-1119 要高得多, N-678 在甲醇中的量子产率为 0.32, 而 N-甲基 NBD 月桂酸 (M-93) 为 0.02。N-316 即 6-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl) amino) hexanoic acid (NBD-X), 分子式 $C_{12}H_{14}N_4O_5$, 分子量为 294.27, CAS 编号/名称为 88235-25-0; N-678 即 12-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazol-4-yl) amino) dodecanoic acid, 分子式 $C_{18}H_{26}N_4O_5$, 分子量为 378.43, CAS

编号 96801-39-7。

丹磺酰十一酸 (DAUDA, D-94) 掺入一个极性的, 环境敏感的丹磺酰荧光团, 优先定位于脂双层膜的极性头部。当 DAUDA 与蛋白质结合后, 其荧光强度增强 60 倍, 光谱向较短波长位移。这种性质可用来分析脂肪酸结合蛋白, 还可通过竞争性脂肪酸取代技术用来发展磷脂酶 A₂ 的荧光比色法。通过荧光能量传递技术用丹磺酰十一酸 (D-94) 磷脂可监测短杆菌肽通道和酸性磷脂囊中 Ca²⁺ 诱导的变化。D-94 即 DAUDA 分子式 C₂₃H₃₄N₂O₄S, 分子量 434.59, CAS 编号 73025-02-2。

当丹磺酰荧光团结合到脂肪酸结合蛋白上后, 其荧光增强 40 倍并有大的光谱位移, 这提高了在脂肪酸完全替代的基础上的荧光测定磷脂酶 A₂ 的检测方法。

4. 十八碳四烯酸 天然多不饱和顺-十八碳四烯酸 (P-1901) 首先是 Hudson 及其合作者作为膜探针应用的, 它是所有可得到的荧光探针中与内源性的膜脂结构最接近的类似物。顺-十八碳四烯酸理化性质已经十分清楚, 它的最低吸收带在 300 nm 和 320 nm 处有两个主要峰值, 在此处其消光系数高。十八碳四烯酸的最为突出的主要光学特点是: 非常大的荧光 Stokes 位移 (约 100 nm) 和在水中几乎完全没有荧光。十八碳四烯酸的衰减寿命从 1 ns 到 40 ns, 这依赖于磷脂双层中分子的包裹密度, 所以可获得脂双层动力学的精确详尽的信息, 侧密度和磷脂定位顺序间的相关性可直接在反十八碳四烯酸的时间分辨荧光双折射衰减中观察到。

在共存的凝胶 (固体) 和液晶态 (液体) 脂质中, 反十八碳四烯酸易分布在固相中, 分配系数大约为 5, 而顺十八碳四烯酸的分布是相等的, 此特点是因为在检测高度有序的脂质区时 P-2 有独特的敏感性, 十八碳四烯酸也有相似的分布, 两个十八碳四烯酸异构体均有很大的脂质/水分配系数。脂质分离相中的部分可从 P-1901 的静态荧光极化中估算出。

十八碳四烯酸与血清白蛋白有很高的亲和力, 其相互反应中伴有荧光增强、吸收位移、被诱导的循环二色性和来自蛋白色氨酸残基的能量传递。十八碳四烯酸从血清白蛋白中的竞争取代被用做检测血清或血浆中游离脂肪酸和脂肪酶活性的基础, 常用的十八碳四烯酸有 P-1901, 即 *cis*-parinaric acid, 分子式为 C₁₈H₂₈O₂, 分子量为 276.42, CAS 编号 593-38-4。

它们主要以下几方面的应用: ①脂蛋白中过氧化物测定、过氧化作用对细胞毒作用的关系、细胞凋亡的检测; ②抗氧化评估; ③脂蛋白结构特性描述; ④脂肪酸结合蛋白和磷脂转运蛋白机制研究; ⑤脂-蛋白相互作用和脂类聚类 (lipid clustering) 检测; ⑥与肌球蛋白亚片段 1 重链和基本轻链之间的疏水口袋高亲和性结合; ⑦用色谱分离法 (chromatographic separation) 检测脂蛋白; ⑧固醇 (特别是胆固醇) 对膜的作用, 通过来自色氨酸的共振能量传递检测的脂质-蛋白间的相互反应脂质转移、融合和代谢, 与低密度脂蛋白 (LDL)、肌球蛋白、肝脂肪酸结合蛋白、磷脂转移蛋白和中性白细胞弹性蛋白酶相互反应、生物合成性的掺入。

十八碳四烯酸具有很强的非饱和性, 对氧化很敏感, 应在惰性气体中储存和处理, 特殊包装的 P-1901 和 P-1902 封在氩气中。

5. DPH 脂肪酸 与 DPH (D-202) 一样, DPH 丙酸 (P-459) 与脂质结合后荧光增强, 对脂质顺序有敏感的荧光双折射性反应。与 TMA-DPH (T-204) 相比, P-459 像表面锚一样限制了探针在膜中的定位分布。P-459 在脂质环境中的荧光量和激发态寿命介于 D-202 和 T-204 之间。P-459 的结合亲和力、从牛血清白蛋白及肝脂肪酸结合蛋白中进行竞争取代的特性, 都与天然脂肪酸一致。在血清膜制备中, P-459 主要分布在脂质单层的外层, 而阳离子衍生物 T-204 容易定位在内层, P-459 和 DPH 羧酸 (P-1342) 荧光的增强可用来检测它们的分配系数。P-459 即 DPH propionic acid, 分子式为 C₂₁H₂₀O₂, 分子量为 304.39, CAS 编号 84294-98-4; T-204 即 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1, 3, 5-hexatriene p-toluenesulfonate (TMA-DPH), 分子式为 C₂₈H₃₁NO₃S, 分子量为 461.62, CAS 编号 115534-33-3。

6. 苝和苝脂肪酸 疏水性的苝烃可轻易融合于膜中, 长链脂肪酸的-苝衍生物在 1975 年由 Galla 和

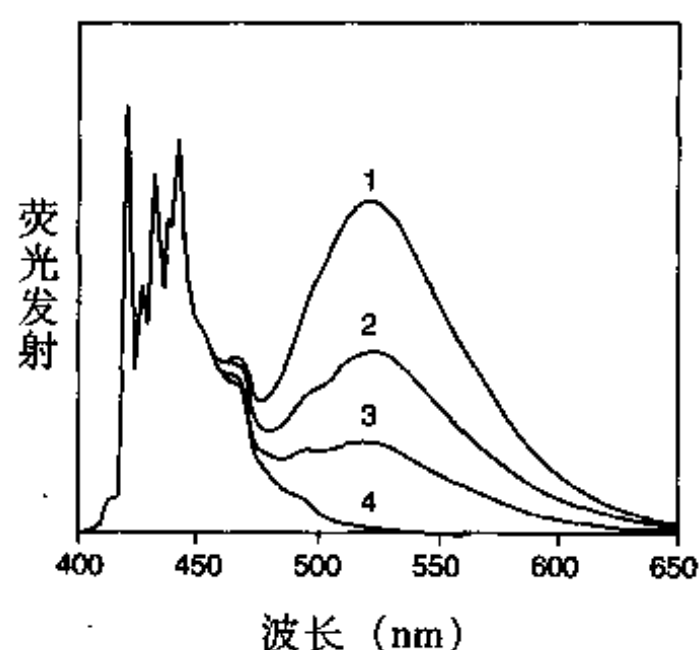


图 23-4 乙醇中芘激发态二聚体形成光谱标准化为单体 371.5 nm 的峰值, 全部光谱在标准化后, 在 400 nm 以下基本是相同的。光谱如下: ① 2 mmol/L 芘, 用氩净化除去氧; ② 2 mmol/L 芘, 空气平衡 (air-equilibrated); ③ 0.5 mmol/L 芘 (氩净化); ④ 2 μ mol/L 芘 (氩净化)。单体与激发态二聚体的比率 (371.5 nm/470 nm) 依赖于芘浓度和激发态寿命, 它可因为氧淬灭发生改变 (引自分子探针公司网上资料)

聚体 (excimers) 伴随荧光发射的红移 (图 23-4)。

当两个芘被一个短的三次甲基间隔子结构 (trimethine spacer) 束缚时, 可连续形成激发态二聚体, 如 1, 3-双-(1-芘基) 丙烷 (B-311), 其分子式为 $C_{35}H_{24}$, 分子量为 444.57, CAS 编号 61549-24-4。芘激发态二聚体的形成常被用来进行膜融合的研究并可用来检测脂类结构域 (domain) 的形成。芘脂肪酸可被活细胞代谢性的掺入磷脂、甘油二酯和甘油三酯、胆固醇酯。芘脂肪酸的其他应用包括: ① 研究脂类转运机制和转运蛋白; ② 检测脂-蛋白相互作用; ③ 研究磷脂酶 A_2 对脂类装配的作用; ④ 诱导光动力的损害; ⑤ 荧光鞘脂探针合成。其他应用见表 23-9。

表 23-9 芘脂肪酸的应用

应用范围	举例
膜和蛋白动力学	(1) 膜流动性和脂质的作用、胆固醇和蛋白组成、脂质转移、融合和代谢 (2) 生物合成性掺入培养的成纤维细胞和入白血病细胞系 (3) 中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 和人白血病细胞中细胞毒的光致敏物 (4) 在成纤维细胞和淋巴细胞系中脂质储存的缺陷
分析应用	(1) 脂质过氧化 (2) 氧感受器 (3) Langmuir-Blodgett 和真空-沉淀膜

另外, 还有一些附着在酰链末端的四环素芘荧光团的脂肪酸, 包括那些带有能分离羧酸功能荧光团的 0、3、5、9、11 和 15 亚甲基团。芘-FA 系列链的全长是不连续的, 此组产物还有芘亚磺酸 (P-80) 和芘月桂酸 (P-646) 及其相应的磷脂 (H-3790), 其他的一些芘基产物 (P-95、P-315) 包括辅酶 A 衍生物 (C-1348) 等。P-80 即 1-pyrenesulfonic acid, sodium salt, 分子式为 $C_{16}H_9NaO_3S$, 分子量为 304.30, CAS 编号 59323-54-5; P-646 即 3-perylenedodecanoic acid, 分子式为 $C_{32}H_{34}O_2$, 分子量为 450.62; H-3790 即 1-hexadecanoyl-2-(3-perylenedodecanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine, 分子式

Sackmann 首先描述。分子探针公司现有许多 4-、6-、10-、12-和 16-碳脂肪酸芘衍生物 (产品编号分别为 P-1903、P-3840、P-31、P-96、P-243)。Pyrenebutanoic acid 经常称为 pyrenebutyric acid (荧光纯级, P-1903) 已经很少用作膜探针, 然而, 它的交联物具有特别长的激发态寿命 ($\tau > 100$ ns), 因此是时间分辨荧光免疫法 (time-resolved fluorescence immunoassay) 和核酸检测的有用试剂, pyrenebutyric acid 的长激发态寿命也使其作为细胞和脂囊 (泡) 的氧探针是很有价值的。P-1903 即 1-pyrenebutanoic acid, 分子式为 $C_{20}H_{16}O_2$, 分子量为 288.35, CAS 编号 25338-56-1; P-3840 即 1-pyrenehexanoic acid, 分子式为 $C_{22}H_{20}O_2$, 分子量为 316.40, CAS 编号 90936-85-9。P-31 即 1-pyrenedecanoic acid, 分子式为 $C_{26}H_{28}O_2$, 分子量为 372.51, CAS 编号 60177-21-1; P-96 即 1-pyrenedodecanoic acid, 分子式为 $C_{28}H_{32}O_2$, 分子量为 400.56, CAS 编号 69168-45-2; P-243 即 1-pyrenehexadecanoic acid, 分子式为 $C_{32}H_{40}O_2$, 分子量为 456.67, CAS 编号 90936-84-8; 芘衍生物形成激发态二

$C_{36}H_{82}NO_8P$, 分子量 928.24。

在一氧化氮脂肪酸荧光淬灭的基础上, 亲脂的芘荧光团在磷脂双层中的横向位置是由结构决定的。事实上, 芘月桂酸 (P-96) 已被用做溴固醇与磷脂双层间相互反应的深度尺度。芘荧光团的激发态寿命较长 (>100 ns), 可形成一个激发态分子的和一常态的单体组成的激发分子, 激发分子的形成是浓度依赖性的, 并可反映荧光团在动力学上的相互作用和非随机的分布。在探针掺入的下面, 磷脂酸胆碱囊中激发分子的形成完全是弥散过程, 同时, 单体到激发分子的发射比率可用于使膜流动性与温度、脂质胆固醇和蛋白组成像互关联, 有了芘月桂酸 (P-31) 单体和激发分子发射比率, 研究者们可用流式细胞计数和比例分析系统显微镜来检测膜的流动性。P-31 即 1-pyrenedecanoic acid, 分子式为 $C_{26}H_{48}O_2$, 分子量为 372.51, CAS 编号 60177-21-1; P-32 即 1-pyrenebutanoic acid (pyrenebutyric acid), 分子式为 $C_{20}H_{16}O_2$, 分子量为 288.35, CAS 编号 25338-56-1。

芘脂肪酸穿过囊或膜间水空间的速率比穿过双层要快得多, 芘月桂酸在含细胞色素 b5 囊中的液体和晶状体蛋白相中的分配是均匀的, 但在凝胶相中, 探针定位在蛋白的附近, 这是通过来自色氨酸残基荧光能量传递的增加检测到的。

与十二碳四烯酸或丹酰、DPH、NBD 和 anthroyloxy 脂肪酸相比, 芘脂肪酸 (尤其是芘月桂酸) 生物合成掺入的水平 and 产物分布均较高。芘脂肪酸还可掺入培养的成纤维细胞和入白血病细胞中, 由于掺入的同时伴有芘荧光的增强, 故不用洗去游离酸。Radom 等报道, 通过检测芘月桂酸的掺入, 可鉴定成纤维细胞和淋巴细胞系中脂质储存的缺陷。芘脂肪酸的独特应用包括作为细胞氧感受器、细胞毒的光致敏物和滤膜中光电子。

虽然芘磺酸 (P-80) 像其他芘衍生物一样形成激发分子, 并与细胞膜相互反应, 但它主要用于探测被转化的分子团。芘月桂酸 (P-646) 衍生物本身的荧光双折射性与理论上的最大值 0.4 接近, 此值高于比芘衍生物。

(二) 亲脂的荧光黄探针

包括伊红 (四溴荧光黄) 衍生物 (D-109、H-110、O-322、H-193) 在内的氨基荧光黄结合到膜上的方式是: 荧光团在水相界面, 而烷基尾则插进脂质内面。十八基酯 F-3857 和十八基硫脲荧光黄 O-3852 均与 O-322 相似, 但在荧光团和烷基尾间有不同的交联。D-109 即 5-dodecanoylamino fluorescein, 分子式为 $C_{32}H_{35}NO_6$, 分子量为 529.63, CAS 编号 107827-77-0; O-322 即 5-octadecanoylamino fluorescein, 分子式为 $C_{38}H_{47}NO_6$, 分子量为 613.79, CAS 编号 110698-53-8; F-3857 即 fluorescein octadecyl ester, 分子式为 $C_{38}H_{48}O_5$, 分子量为 584.79; O-3852 即 N-octadecyl-N'-(5-fluoresceinyl) thiourea (F18), 分子式为 $C_{39}H_{50}N_2O_5S$, 分子量为 658.89。

显微光解研究说明, H-110 主要在上皮的外侧膜不穿过紧密连接, 而十二酰氨基荧光黄 (D-109) 在 20°C 时可翻转到内侧膜 ($<10^{\circ}\text{C}$ 时不行) 也可穿过紧密连接。伊红类似物 (H-193) 比荧光素衍生物的波长长, 而且对 pH 不敏感, 同时, H-193 也能从荧光黄标记蛋白得到能量转移的膜结合受体。亲脂荧光黄探针还可用来研究膜和蛋白动力学: 通过荧光-光淬灭恢复检测侧弥散; 以及研究脂质转移、融合和代谢: 进行囊融合和侧弥散过程的监测。

(三) 苯胺基萘磺酸盐

苯胺基萘磺酸盐膜表面和蛋白有价值的探针, 其主要成员是 1, 8-ANS (A-47)。A-47 和它的类似物 A-50 和 T-53 在水中基本无荧光, 只有结合到膜上才会有适量的荧光 (量子产率 QY 为 0.25), 当与蛋白结合后荧光增强 (QY 为 0.7), 此特点使得它们成为研究蛋白折叠的敏感探针, 为研究金属离子和谷氨酸合成酶结合以及确定 H^+ -ATP 酶和磷脂酶激酶的活性提供了方法。A-47 即 1-anilinonaphthalene-8-sulfonic acid (1, 8-ANS), 分子式为 $C_{16}H_{13}NO_3S$, 分子量为 299.34, CAS 编号/名称为 82-76-8; A-50 即 2-anilinonaphthalene-6-sulfonic acid (2, 6-ANS), 分子式为 $C_{16}H_{13}NO_3S$, 分子量为 299.34, CAS 编号/名称: 20096-86-0; T-53 即 2-(p-toluidinyl) naphthalene-6-sulfonic acid, sodium salt (2, 6-

表 23-10 苯氨基萘磺酸盐的应用

研究范围	应用
膜和蛋白结构	①蛋白构造的变化 ②结合到谷氨酸合成酶的金属离子 ③结合磷脂的药物 ④在脂质-水界面的静电位 ⑤Ca ²⁺ 与脂双层表面的反应
膜和蛋白的动力学	①H ⁺ -ATP 酶的活性 ②磷酸化酶激酶的活性
分析应用	①(A-50)敏感性的替代检测亲和素(或生物素) ②在 SDS 凝胶中不用脱色检测蛋白 ③在 TLC 上定量脂质 ④关键分子团的浓度 ⑤阳离子选择性光感受器

TNS), 分子式为 $C_{17}H_{14}NNaO_3S$, 分子量为 335.35, CAS 编号 53313-85-2; B-153 即 *bis*-ANS (4, 4'-dianilino-1, 1'-binaphthyl-5, 5'-disulfonic acid, dipotassium salt), 分子式为 $C_{22}H_{12}K_2N_2O_6S_2$, 分子量为 672.85, CAS 编号 65664-81-5; 主要应用范围如下, 见表 23-10。

顺-ANS (B-153) 作为蛋白中非极性腔的探针比 1, 8-ANS 好, 顺-ANS 尤其对蛋白的核酸结合位点有高亲和力, 它也抑制微管的聚集, 并阻止蛋白单体的聚集。

(四) 一氧化氮和反应性脂肪酸

1. 反应性脂肪酸 光反应性叠氮萘脂肪酸 A-2502 可用来标记膜蛋白, 从而提供蛋白相对于膜表面的局部结构。采用生物素-亲和素方法对脂肪酸进行组化定位时, 可使用生物素标记的类似物 B-2602。两探针的氨基反应性琥珀酰亚胺酯 (A-2503、B-2603) 提供了一个制备长的非极性膜间交联的方法。B-2603 即 12-((biotinoyl) amino) dodecanoic acid, succinimidyl ester, 分子式为 $C_{26}H_{42}N_4O_6S$, 分子量为 538.70。

2. 一氧化氮脂肪酸 分子探针公司生产一氧化氮标记的脂肪酸 D-524, 一氧化氮脂肪酸已被用于评价外源性荧光探针和蛋白色氨酸残基在脂质双层中的定位。

(五) ADIFAB 和 I-FABP

脂肪酸结合蛋白是在许多哺乳动物的组织中发现的小胞质蛋白, 对它们生理学功能的研究经常要使用荧光脂肪酸探针。为满足这种需要, 分子探针公司提供大鼠小肠脂肪酸结合蛋白, 它是一种低分子量 (15 000 daltons) 蛋白, 与游离脂肪酸有高亲和力 (I-FABP, I-3881)。与病理过程 (如癌和糖尿病) 有关的游离脂肪酸 (FFA) 的增加是炎症反应、磷脂酶 A 活性和细胞毒现象的结果。花生四烯酸在细胞信号系统中作为第二信使有重要的作用。由 Alan Kleinfeld 等发展的新的双波长荧光 FFA 指示剂 ADIFAB, 不需其他生物方法即可进行 FFA 的定量监测, ADIFAB (A-3880) 是 acrylodan (一种对极性敏感的荧光团) 与脂肪酸结合蛋白 (I-FABP) 的交联物, 是双波长游离脂肪酸荧光探针, 其结构模式图如彩图 8 所示。

A-3880 被设计用来定量监测游离脂肪酸的浓度, 而不需要采用生化分离的方法。使用 ADIFAB 确定的游离脂肪酸浓度范围界于 1~20 $\mu\text{mol/L}$ 之间, 用 FFA 滴定 ADIFAB 可使其最大发射波长从 432 nm 变到 505 nm。用 385~390 nm 激发, 未络合 ADIFAB 的 R 值为 0.2~0.3 (依赖 pH), 最大能上升到 6。油酸典型的 K_d 值为 0.28 $\mu\text{mol/L}$ 。应用 K_d 值, 可用像 Ca^{2+} 荧光探针同样的分析步骤将 R 值转化成 FFA 浓度。

五、阳离子膜探针

虽然阳离子型膜探针在结构上与膜成分不相似，但它是两亲性的，能和脂质双层作用。亲脂的碳花青和二烷基氨基苯乙烯基荧光探针常用作神经元的示踪剂，Wolf 对亲脂碳花青的光谱学性质和物理性质进行了综述。许多阳离子探针包括 TMA-DPH、TMAP-DPH 和 patman 易定位在胞膜，可监测能改变膜表面积和细胞体积的因素，新的亲脂性吡啶基噻唑荧光探针是在蓝色波长范围最常用的荧光阳离子探针。

(一) 亲脂性的碳花青

碳花青属于已知的吸收最强的荧光探针之列，具有荧光探针的多种效用。那些短烷基尾连在亚胺氮上的碳花青可用做膜电位传感器 (sensor)，并可作为线粒体及内质网等细胞器的染料；那些具有长烷基尾 (≥ 12 碳原子) 的碳花青基本是亲脂性的，因此常作为神经元示踪剂应用，也可用于培养细胞的长期标记和脂蛋白的非共价标记。此处主要叙述用于膜结构和膜动力学的膜探针二烷基碳花青的用途和性质。应用最广泛的碳花青膜探针有十八烷基 (C_{18}) 吡啶碳花青 (D-282、D-3911) 和 oxacarbocyanines (D-275)，常缩写成 DiI 和 DiO 或更明确地写成 $DiIC_{18}(3)$ 和 $DiOC_{18}(3)$ (下标表示每个烷基尾中碳原子数，括号内的数为在二氢吡啶或苯并噻唑环间桥梁中的碳原子数)，晶状体的 $DiIC_{18}(3)$ (D-3911) 可用来标记神经元。常用的碳花青包括：① 带有不饱和烷基尾的 DiI 和 DiO 类似物 (9-DiI, D-3886; FAST DiO, D-3898; FAST DiI, D-3899, D-7756)；② 带有短烷基尾的 DiI 和 DiO 类似物 [$DiIC_{12}(3)$, D-383; $DiIC_{16}(3)$, D-384; $DiOC_{16}(3)$, D-1125]；③ 长波长光激发的碳花青 (DiD, D-307, D-7757)；④ 红外光激发的碳花青 (DiR, D-12731)；⑤ DiI、DiO 的苯基取代物和硫代衍生物。

但 C_{16} 和 C_{18} 硫代碳花青 (DiS; D-494, D-1121) 一般不作为神经元的示踪剂，但能研究聚合膜， $DiIC_{12}$ (D-383)、 $DiIC_{16}$ (D-384) 和 $DiOC_{16}$ (D-1125) 比 C_{18} 类似物更易掺入膜内。D-383 和新的非饱和 DiI 和 DiO 类似物 (D-3886、D-3898、D-3899) 不结晶，故保存在甲醇中， $DiIC_{16}(3)$ (D-384) 为低熔点固体，保存时易变粘。

二烷基碳花青的光学性质在很大程度上不依赖烷基链的长短，而由末端环系统中杂原子 (heteroatoms) 和连接桥的长短决定。 $DiIC_n(3)$ 和 $DiSC_n(3)$ 探针的吸收和荧光光谱与罗丹明 (TRITC) 光学滤片组相匹配 (图 23-5)，而 $DiOC_n(3)$ 类似物应使用荧光黄类 (FITC) 光学滤片组 (图 23-6)。

1. 取代的 DiI 和 DiO 衍生物 目前已经有许多合成的 DiI、DiO 和 DiD 的衍生物，所有这些衍生物都与 All DiI (D-282、D-3911) 和 DiO (D-275) 一样具有十八烷基 (C_{18}) 尾，因此保持了母体分子的杰出膜滞留 (membrane retention) 特性。许多取代物为二氢吡啶或苯并噻唑环系统，包括以下物质：① 氯苯甲酰氨基 (Chloromethylbenzamido) DiI 衍生物 (CellTracker CM-DiI, C-7000, C-7001)；② 联苯 DiI [5, 5'-Ph₂- $DiIC_{18}(3)$, D-7779]；③ 阴离子磺苯基 (Anionic sulfophenyl) [SP- $DiIC_{18}(3)$, D-7777; SP- $DiOC_{18}(3)$, D-7778] 或磺化衍生物 ($DiIC_{18}(3)$ -DS, D-7776; $DiIC_{18}(5)$ -DS, D-12730]。

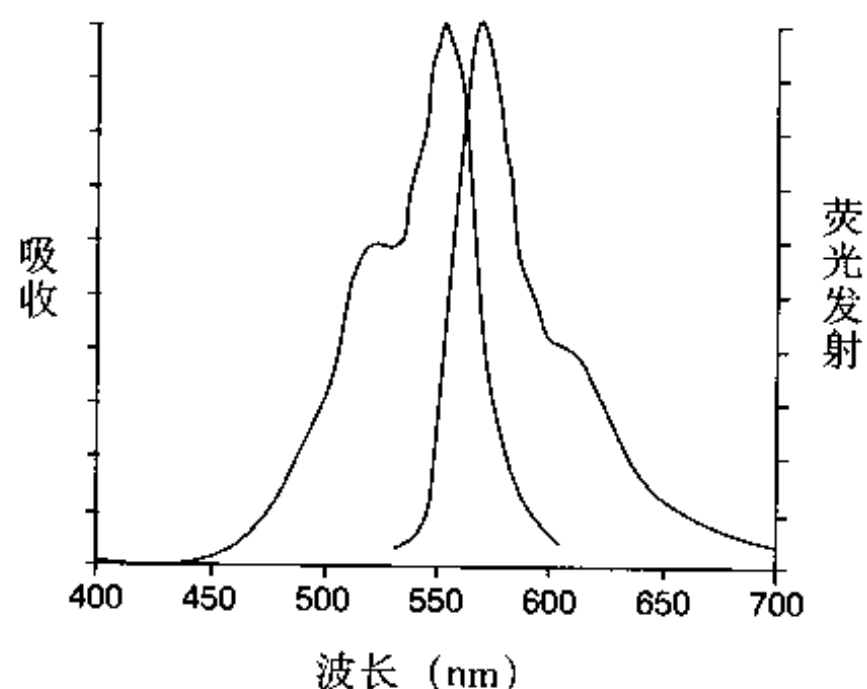


图 23-5 与磷脂双层膜结合的 $DiIC_{18}(3)$ (“DiI”, D-282, D-3911) 吸收和荧光发射光谱

都与 All DiI (D-282、D-3911) 和 DiO (D-275) 一样具有十八烷基 (C_{18}) 尾，因此保持了母体分子的杰出膜滞留 (membrane retention) 特性。许多取代物为二氢吡啶或苯并噻唑环系统，包括以下物质：① 氯苯甲酰氨基 (Chloromethylbenzamido) DiI 衍生物 (CellTracker CM-DiI, C-7000, C-7001)；② 联苯 DiI [5, 5'-Ph₂- $DiIC_{18}(3)$, D-7779]；③ 阴离子磺苯基 (Anionic sulfophenyl) [SP- $DiIC_{18}(3)$, D-7777; SP- $DiOC_{18}(3)$, D-7778] 或磺化衍生物 ($DiIC_{18}(3)$ -DS, D-7776; $DiIC_{18}(5)$ -DS, D-12730]。

掺入二十八碳烯酰磷脂酰胆碱 (dioleoyl PC 或 DOPC) 脂质体中的 $DiIC_{18}(3)$ 和 $DiOC_{18}(3)$ 的最大发射波长与这些染料在甲醇中的最大发射波长相似，氦氖激光激发的吡啶二碳花青如 $DiIC_{18}(5)$ (D-307) 有很长的吸收和红色激发光，其消光系数大，荧光量

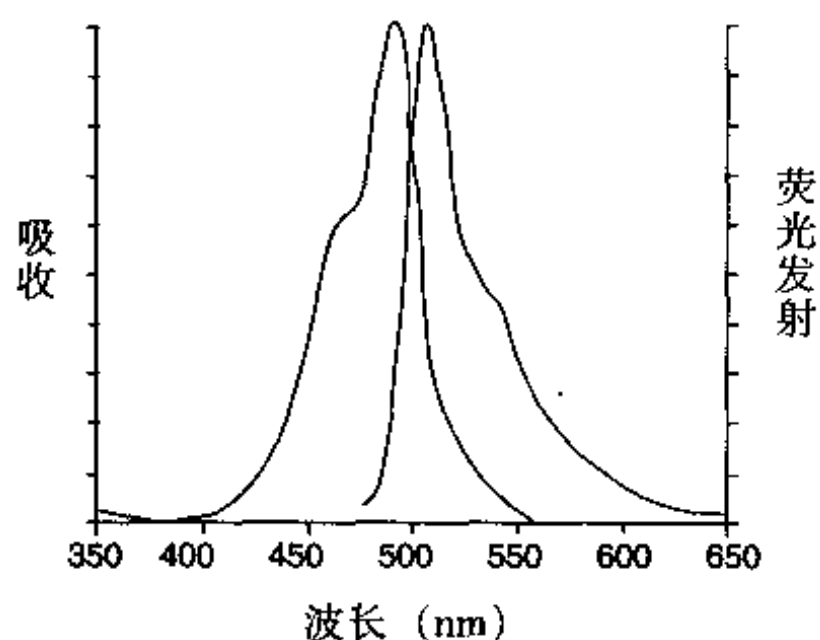


图 23-6 与磷脂双层膜结合的 $\text{DiOC}_{18}(3)$ (“ DiO ”, D-275) 吸收和荧光发射光谱

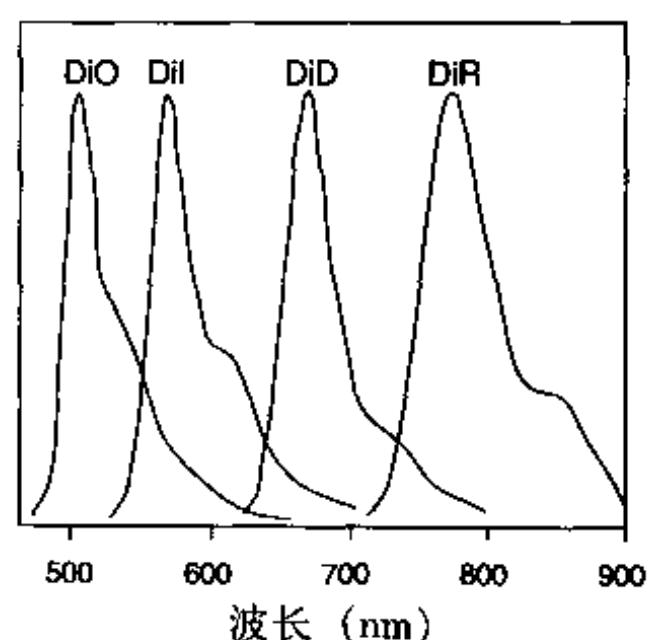


图 23-7 与磷脂双层膜结合的 DiO (D-275)、 DiI (D-282)、 DiD (D-307) 和 DiR (D-12731) 标准荧光发射光谱

比碳花青 $\text{DiIC}_{18}(3)$ 大, 此外, 在活细胞 $\text{DiIC}_{18}(5)$ 的光激发造成的损伤比 $\text{DiIC}_{18}(3)$ 小。 $\text{DiIC}_{18}(7)$ 三碳花青探针 (DiR , D-12731) 激发和发射波长在红外区 (图 23-7), 因此可作为体内示踪剂应用在活的生物体标记细胞和脂质体。

碳花青荧光探针最突出的光谱性质是具有非常大的摩尔消光系数, 它们的荧光量子产率唯一最大的是 DiI , 在甲醇中其荧光量子产率为 0.07, 大约比在双亲性溶剂如辛醇中大 3 倍。在脂质环境中碳花青荧光团的激发态寿命短 (约 1 ns), 对流式细胞分析则是优点, 因为可以在流体通过的过程中, 会产生更多的激发/去激发循环 (excitation/de-excitation cycle)。整体荧光衰减是多指数的, 二烷基碳花青还具有特别的光稳定性。

虽然这些衍生物主要被用在长期的细胞示踪实验, 使固定和标记得以改良, 但也用于膜结构和膜动力学研究。磺苯基和苯基衍生物的荧光量子产率 (甲醇中测定值) 通常是比 DiI 和 DiO 大 2~3 倍。已经

发现, 与磷脂模型膜结合的磺苯基衍生物 (D-7777、D-7778) 分别比 DiI 和 DiO 的荧光量子产率差大约高 5 倍。 $\text{DiIC}_{18}(5)$ -DS (D-12730) 与 NBD-标记的甘油磷酸丝氨酸探针联合应用于一种新的共振能量传递试验 (resonance energy transfer assay), 该试验可探测内部单层膜半融合 (hemifusion), 可避免由于脂类混合产生的膜融合的不正确指标和防止外部单层膜其他环境因素的影响。磺化的碳花青具有负电荷和更大的水溶性, 使得它们在脂双层的纵向和横向分布相对于 DiI 和 DiO 得到改进, 这些特点可用来识别内耳外毛细胞的细胞膜上对电刺激起反应的脂类结构域。

2. DiI 和 DiO 作为膜结构探针 荧光偏振显微镜可确定 $\text{DiIC}_{18}(3)$ 在膜中的定位, 荧光团的长轴与膜表面平行, 两个烷基链垂直插入脂质内部 (图 23-8)。

文献中对吖啶碳花青的跨膜移动 (“flip-

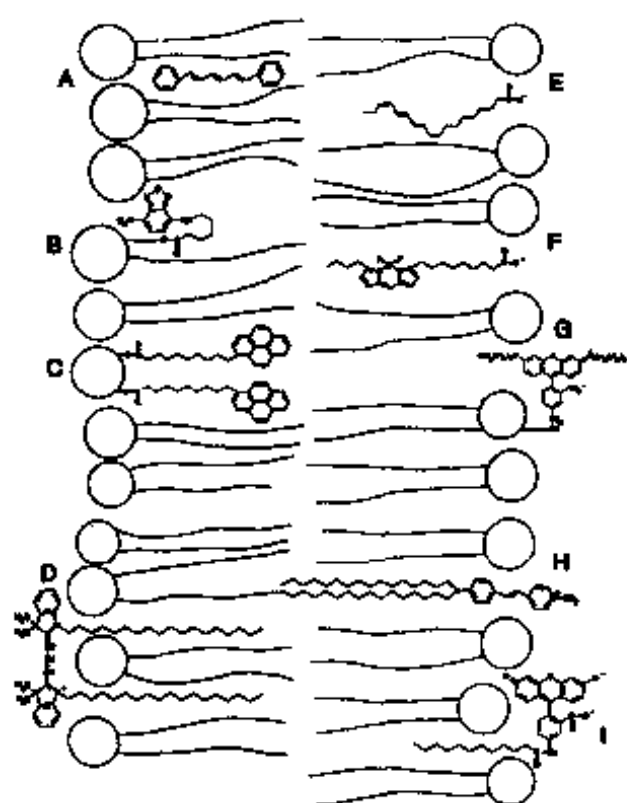


图 23-8 代表性的荧光膜探针在磷脂双分子层的位置和定向。
A: DPH (D-202); B: $\text{NBD-C}_6\text{-HPC}$ (N-3786); C: bis-pyrene-PC (B-3782); D: DiI (D-282); E: $\text{cis-parinaric acid}$ (P-1901); F: $\text{C}_5\text{-BODIPY 500510 C}_8$ (D-3825); G: N-Rh-PE (L-1392); H: DiA (D-3883); I: $\text{C}_{12}\text{-fluorescein}$ (D-109)

flop”)意见不一。二烷基酰碳花青的侧向分区行为 (lateral partitioning behavior) 可用荧光漂白恢复法 (FRAP)、量热法、寿命测量法 (lifetime measurements) 和荧光共振能量传递 (Fluorescence Resonance Energy Transfer, FRET) 技术进行测定。研究证实在共存的液相和凝胶相脂质之间, 探针的分布依赖于探针和脂质烷基链长度的相似性, 一般来说, 长度越不同, 越优先分布在液相脂质, 而非凝胶相脂质, 例如短链的 DiIC_{12} (3) (D-383) 在二十八烯酰磷脂酰胆碱 (DOPC) 中主要分布在液相 (约 6:1), 而 DiIC_{18} (3) (D-282) 则主要分布在凝胶相中 (约 1:10)。所以, 长链的二烷基碳花青是检测刚性凝胶相的最好探针。

亲脂性的碳花青已被用来观察膜融合和在电场作用下细胞通透性的变化, 也被用来观察脂质体和平面双分子层的融合。膜融合也可通过测定从丹磺酰-或 NBD-标记的磷脂供体到 DiIC_{18} (3) 的荧光共振能量传递进行检测, 通过直接成像也可检测。因为荧光团有利的位置取向, 在 Langmuir-Blodgett 薄膜中, 从 DiIC_{18} (3) 到 DiIC_{18} (5) 的激发态能量传递相当有效, 从 DiIC_{18} (5) 到 DiIC_{18} (7) 的能量传递也有类似效果。亲脂性的碳花青已经用于阐明脂质体的光敏感去稳定作用、致敏病毒糖蛋白血球凝集素光亲和标记、在脂类单分子层显示膜结构域以及发展光纤钾传感器。亲脂碳花青能非共价标记疏水性很强的生物分子。

采用光漂白恢复 (FRAP) 技术, 二烷基碳花青广泛用于检测侧弥散过程。在分离的液相和凝胶相双层中侧弥散系数不依赖碳花青烷基链的长短。亲脂性的碳花青被染料的相分离群 (phase-separated populations) 可通过测定它们的弥散速率进行区分, 因此可用来确定细胞膜的侧向结构域。标记蛋白和脂质的联合侧向弥散测定说明转化的和通透性的细胞蛋白弥散发生了显著改变, 而脂质弥散速率保持不变。在酵母细胞膜相对固定的脂质结构域可发现脂质和蛋白质运动的耦合, 在 IgE 受体复合物周围也可发现相同的现象。依赖弥散性荧光恢复的缺失, 一种不同的光漂白技术, 可用来在运动细胞确定脂类流动的方向, 可通过追随 DiIC_{16} (3) 的光漂白条纹来确定。烷基链的不饱和性有利于探针的扩散, 快速 DiO 和 DiI (D-3898, D-3899) 含有不饱和的烷基链片段, 因此比 DiO 和 DiI 的弥散率快。在共存的分离相体系中鉴于上述提到的原因侧弥散是链长依赖性的, 研究者们利用 DiIC_{16} (3) 和 FRAP 研究了成年哺乳动物的精子浆膜内不同脂质移动性的区域, FRAP 的其他应用是利用 DiIC_{18} (3) 作为扩散标记物检查线粒体的电子转移。通过极化光漂白恢复, 用二烷基碳花青可检测到膜中从毫秒到秒水平的慢旋转扩散过程。极化荧光排除法对毫秒级的旋转动作敏感。

(二) 二烷基氨基苯乙烯基探针

亲脂性的氨基苯乙烯基探针 4-Di-10-ASP (D-291)、DiA、(D-3883) 和 FAST DiA (D-3897、D-7758), 将它们两个烷基尾及其与磷脂酰链平行的荧光团插入膜中 (图 23-8), 当这些探针与膜结合后, 其荧光强度明显增强, 它们的荧光强度在水中是最低的。氨基苯乙烯基荧光团在界面溶解可使膜结合探针的吸收光谱发生较大的蓝移。当二十六基氨基苯乙烯基探针 DiA (D-3883) 掺入到二十八烯酰磷脂酰胆碱 (DOPC) 脂质体时, 其最大吸收波长为 456 nm, 在甲醇中则为 490 nm。在膜环境中其最大荧光发射波长为 590 nm, 与有短烷基尾的探针 (如 4-Di-10-ASP) 十分相近, 但其荧光光谱仍很宽, 强度大约为 510~690 nm (图 23-9)。

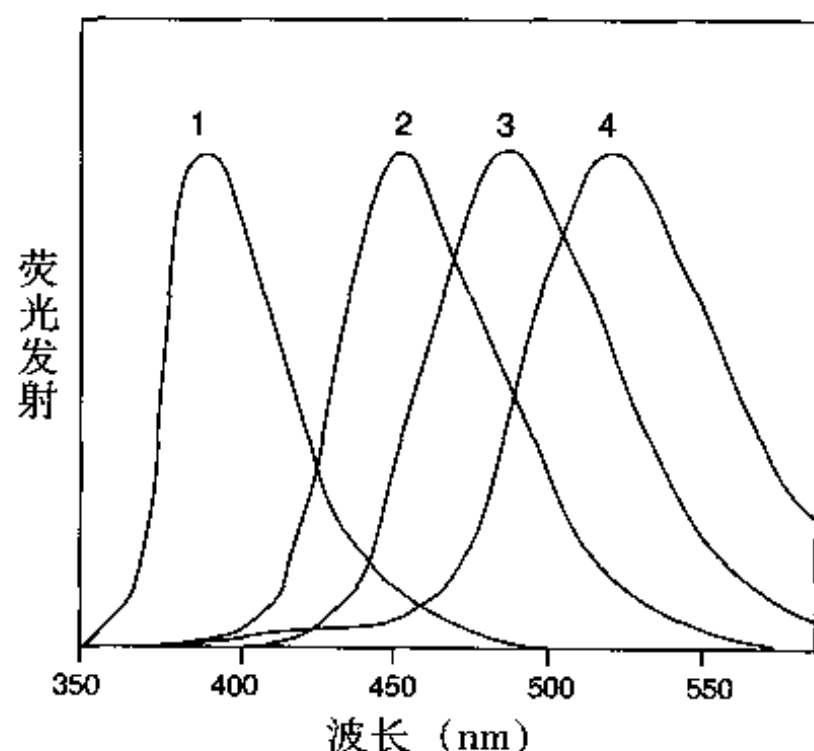


图 23-9 不同溶剂中 Prodan (P-248) 的标准发射光谱。1: 环己烷; 2: 二甲酰胺; 3: 乙醇; 4: 水

由于所用滤光片的不同, DiA 可为绿色、橘黄色或红色荧光。像亲脂性的碳花青一样, DiA 常用来进

行神经元膜示踪研究。FAST DiA (D-3897、D-7758), DiA 的双不饱和类似物由于可加速染料在膜内的弥散, 因此更适合进行以上研究。D-291 即 4-Di-10-ASP, 分子式为 $C_{34}H_{55}IN_2$, 分子量为 618.73, CAS 编号 95378-73-7; D-3883 (DiA) 即 4-(4-(dihexadecylamino) styryl) -N-methylpyridinium iodide (DiA, 4-Di-16-ASP), 分子式为 $C_{46}H_{79}IN_2$, 分子量为 787.05。D-3897 即 FAST DiA oil; Di9, 分子式为 $C_{30}H_{79}IN_2$, 分子量为 835.09; D-7758 即 FAST DiA solid; Di9, CBS), 分子式为 $C_{36}H_{83}ClN_2O_3S$, 分子量 899.80; D-3885 (DiQ) 即 Di-16-ASQ, 是一种橙红色荧光亲脂性的示踪剂, 与 DiA 一样作为次要示踪剂使用。

常用的亲脂性碳花青和氨基苯乙烯基示踪剂及其特点、用途总结如表 23-11。

表 23-11 常用的亲脂性碳花青和氨基苯乙烯基示踪剂

产品号	探针	特性
DiI 及其 类似物	D-282 DiIC ₁₈ (3) "DiI"	亲脂性的橙红色荧光探针, 广泛用作神经元示踪剂
	D-3911 DiIC ₁₈ (3) "DiI"	D-282 大晶体型, 易于直接应用于膜研究
	D-384 DiIC ₁₆ (3)	短链 DiI 类似物, 比 DiI 更容易掺入膜内
	D-383 DiIC ₁₂ (3)	短链 DiI 类似物, 比 DiI 更容易掺入膜内
	D-3899 FAST DiI oil	不饱和 DiI 类似物, 在膜内迁移比 DiI 快约 50%
	D-7756 FAST DiI	D-3899 固体型, 易于直接应用于膜研究
	D-3886 DELTA9-DiI oil	不饱和 DiI 类似物, 在膜内比 DiI 迁移更快
	C-7000 CellTracker CM-DiI	氯甲基 DiI 类似物, 在培养基中溶解性增强, 在固定后仍保留
	F-6999 FM-DiI	DiI 类似物, 在培养基中溶解性增强
	D-7779 5, 5'-Ph2-DiIC ₁₈ (3)	亲脂性更强的 DiI 类似物, 光量子产率高, 光谱波长更长 (红移约 20 nm)
	D-7780 6, 6'-Ph2-DiIC ₁₈ (3)	亲脂性更强的 DiI 类似物, 光量子产率更高, 但光谱相似
	D-7777 SP-DiIC ₁₈ (3)	阴离子的 DiI 类似物, 在培养基中溶解性增加, 固定后仍保留
	D-7776 DiIC ₁₈ (3) -DS	阴离子的 DiI 类似物, 在培养基中溶解性增加, 固定后仍保留
	D-7766 Br ₂ -DiIC ₁₈ (3)	溴化的 DiI 类似物, 可用于 DAB 光转化 (photoconversion)
DiD	D-307 DiIC ₁₈ (5) oil "DiD"	更长波长的 DiI 类似物, 用于自发荧光标本, 与 DiI 一样作为次要示踪剂
	D-7757 DiIC ₁₈ (5) "DiD"	D-307 的固体型, 易于直接应用于膜研究
DiO 及其 类似物	D-275 DiOC ₁₈ (3) "DiO"	黄绿色荧光亲脂性的探针, 与 DiI 一样广泛用作次要示踪剂
	D-1125 DiOC ₁₆ (3)	短链 DiO 类似物, 比 DiO 更易掺入膜内
	D-3898 FAST DiO	DiO 的不饱和类似物, 在膜内比 DiO 迁移约快 50%
	D-7770 5, 5'-Ph2-DiOC ₁₈ (3)	亲脂性更强的 DiO 类似物, 光量子产率更高, 光谱波长更长 (红移约 10 nm)
	D-7778 SP-DiOC ₁₈ (3)	阴离子 DiO 类似物, 水溶性增强, 固定后仍保留
	D-7767 Br ₂ -DiOC ₁₈ (3)	溴化的 DiO 类似物, 可用于 DAB 光转化
DiA 及其 类似物	D-3883 4-Di-16-ASP "DiA"	黄绿色荧光亲脂性的探针, 与 DiI 一样用作次要示踪剂
	D-3897 FAST DiA oil	DiA 的不饱和类似物, 在膜内比 DiA 迁移更快
	D-7758 FAST DiA	D-3897 的固体型, 易于直接应用于膜研究
	D-291 4-Di-10-ASP	短链 DiA 类似物, 比 DiA 更易掺入膜内
DiQ	D-3885 Di-16-ASQ "DiQ"	橙红色荧光亲脂性的示踪剂, 与 DiA 一样用作次要示踪剂

(三) 单链阳离子荧光团

1. 十八烷基罗丹明 B 十八烷基罗丹明 B 用于监测膜融合, 有人将 R₁₈ (十八烷基罗丹明 B, O-

246) 和视频显微镜检查或数字成像技术联合使用监测病毒融合的过程。膜融合也可通过下述方法观察: 监控从酰氨基荧光黄供体 (acylamino fluorescein donor) 到十八烷基罗丹明 B 的荧光共振能量传递, 常用的酰氨基荧光黄供体为 5-十八烷酰氨基荧光黄 (O-322)。从荧光黄或丹磺酰标记物到 R18 的荧光共振能量传递已被用来进行凝血因子 IXa、EGF 受体和受体结合的 IgE 的结构研究。O-246 可用于染色产生 kinesin (kinesin-generated) 的膜小管、鉴定去垢剂微团、进行蛋白质溶酶体降解分析。用时间分辨荧光各向异性 (anisotropy) 来研究蛋白对脂类动力学的影响, 通过流式细胞分选术来选择体细胞杂合子, 研究快速轴相转移的机制。O-246 即十八烷基罗丹明 B 盐酸盐 (R_{18}), 分子式为 $C_{46}H_{67}ClN_2O_3$, 分子量为 731.50, CAS 编号 65603-19-2; O-322 即 5-octadecanoylamino fluorescein, 分子式为 $C_{38}H_{47}NO_6$, 分子量为 613.79, CAS 编号 110698-53-8。

2. 蓝色荧光阳离子膜探针 蓝色荧光亲脂性吡啶基噻唑探针 C_{12} -PyPO (P-3891) 和 C_{18} -PyPo (P-3892) 是荧光染料 5-苯基-4-吡啶基-2-噻唑的衍生物。在有机溶剂 (甲醇) 或附在脂质体 (DOPC) 中的吸收波长均靠近紫外 380 nm 处, 其荧光 Stokes 位移大、发射光谱宽, 最大发射波长为 480 nm, 摩尔消光系数小、量子产率高、在水相的背景荧光低, P-3892 比亲脂性的碳花青探针更易淬灭。

3. 其他的单链阳离子探针 三种吡啶橙类似物 (A-455、A-1372、A-3884) 主要用在长期的线粒体膜染色。D-531 淬灭 BODIPY 磷脂和 anthroyloxy 脂肪酸 (A-36) 十分有效, 提示一氧化氮可穿入膜内。A-1372 即 acridine orange 10-nonyl bromide (nonyl acridine orange), 分子式为 $C_{26}H_{38}BrN_3$, 分子量为 472.51, CAS 编号/名称为 75168-11-5。

4. 三甲铵 DPH 和蔡探针 阳离子 DPH 类似物 TMA-DPH (T-204) 的光学性质与中性探针 DPH (D-202)、磷脂 (D-476)、阴离子衍生物 (P-459、P-1342) 的相似。TMA-DPH 带电的取代基像表面锚一样, 与 D-202 相比提高了探针在膜中的定位。TMA-DPH 染色细胞膜比 DPH 快得多, 探针被内在化前, 表面染色常持续数分钟。用一氧化氮标记的磷脂进行的 T-204 荧光淬灭与 DPH-磷脂酰胆碱 (D-476) 的几乎没有差别, TMA-DPH 的荧光寿命对脂质成分和温度的变化比 DPH 更敏感。新的 TMAP-DPH (P-3900) 在荧光团和末端三甲铵取代物间插入了另外一个三碳空间形成了大约与阴离子衍生物一样长的探针。相对于 DPH ($K_p=1.3 \times 10^6$) 来说, TMA-DPH 和 TMAP-DPH 上的极性取代基降低了 TMA-DPH ($K_p=2.4 \times 10^5$) 和 TMZP-DPH ($K_p=2.9 \times 10^5$) 的脂质-水分配系数 K_p , 因此其水溶性增加。T-204 在 MDCK 细胞质膜中的定位优先于阴离子 P-3900, 阳离子探针不能弥散通过紧密连接而保留在顶部区域, 而 P-459 则快速聚集到细胞膜内, 浆膜内的 TMA-DPH 可用介质冲洗的方法提取。在水中 TMA-DPH 事实上是无荧光的, 可部分结合到合适的膜表面。它的荧光强度对可改变膜表面积的过程敏感, 为监测如细胞体积的改变提供了方法。TMA-DPH 的圆柱状对称和高度的荧光双折射性使得它在检测膜流动性上得到广泛使用。最近章丽金等即采用 DPH 研究了表皮生长因子 (EGF)、神经降压素 (NT) 对四氯化碳损伤的原代培养肝细胞膜流动性的影响。

像 Prodan 和 laurodan 一样, 阳离子氨基蔡探针 Patman (H-1387) 的发射对溶解的温度和速度十分敏感, 在 DMPC 相转换时从 425 nm 变化到 475 nm。Patman 对活细胞膜流动性的比率图像分析也很有效, Patman 可快速染外侧的浆膜, 其对内在化的抵制也比 TMA-DPH 强。T-204 即 1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1, 3, 5-hexatriene p-toluenesulfonate (TMA-DPH), 分子式为 $C_{28}H_{31}NO_3S$, 分子量为 461.62, CAS 编号/名称为 115534-33-3; D-476 即 DPH HPC, 分子式为 $C_{45}H_{69}NO_8P$, 分子量为 782.01, CAS 编号/名称为 98014-38-1; P-3900 即 TMAP-DPH, 分子式为 $C_{31}H_{37}NO_3S$, 分子量为 503.70; H-1387 即 patman, 分子式为 $C_{32}H_{33}ClN_2O$, 分子量为 517.24, CAS 编号/名称为 87393-54-2。

六、其他非极性和双亲性膜探针

非极性和双亲性 (电中性) 探针, 有可能对膜有特异的亲和力。除固醇类似物外, 这些探针与膜固

有成分的相似性是不明确的, 虽然它们易分配到非极性溶液中, 但在膜中的位置是十分弥散的。许多探针有对外环境敏感的光学特性, 可用来研究各种各样的固有膜的性质。在此还有一种可在活细胞中还原脂质的试剂 $\text{Pd}(\text{QS})_2$, 此试剂在膜组成和细胞活性的相关性上是有用的。

(一) 非极性 BODIPY 探针

非极性 BODIPY 探针有长的吸收和荧光波长, 每种 BODIPY 衍生物具有独特的最大吸收和发射波长, Stokes 位移较小、消光系数较大、荧光量子产率很高 (D-3921 为 0.94)。BODIPY 的荧光量在水中不会内部淬灭而产生很强的背景荧光, 尽管如此, 多数尤其是有多芳香基取代物的探针将会聚集在水性介质中造成分子间的自身淬灭, D-3921 和 D-3922 是很好的激光染料, D-3921 即 4, 4-difluoro-1, 3, 5, 7-tetramethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene (BODIPY (r) 505/515), 分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{BF}_2\text{N}_2$, 分子量为 248.08; D-3922 即 4, 4-difluoro-1, 3, 5, 7, 8-pentamethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene (BODIPY (r) 493/503), 分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{17}\text{BF}_2\text{N}_2$, 分子量为 262.11, CAS 编号/名称为 121207-31-6。

(二) DPH、尼罗红和 NPN

二苯己三烯 (DPH, D-202)、尼罗红 (N-1142) 和 N-苯基-萘胺 (P-65) 是有效的脂质染料。其在水中的荧光很小, 但随着与脂质的结合荧光增加, 此特性可用来测定色谱分离中的脂质及确定关键分子团的浓度。

1. DPH Shinitzky 和 Barenholz 在 1970 年初将 DPH (D-202) 用做膜内部的荧光探针, 它在脂质双层中特异性定位差, 但它一直被广泛使用。DPH 的主要应用是在荧光偏振法的基础上评价膜流动性, DPH 可用于检查能调节膜流动性的许多生理变量, 包括脂肪酸的组成、酒精、磷脂酸乙醇、固醇、杀虫剂、甘油二酯、药物诱导的细胞色素 P-450 活性和醚脂质。中性二甲胺 DPH 衍生物 (DMA-DPH, D-203) 的光学性质与 DPH (D-202) 的十分不同, DMA-DPH 在极性溶剂中的发射光谱会位移, 但掺入脂双层中后比 DPH 的荧光少。

2. 尼罗红 吩噻嗪荧光探针尼罗红 (N-1142) 用来定位脂质, 尤其是细胞中的中性脂质沉淀, 它对中性脂质如胆固醇酯 (脂蛋白) 有选择性, 但也适用于一般的膜染色。尼罗红在水和极性溶剂中几乎无荧光, 在非极性环境中, 其荧光增强, 有较大的吸收及发射波长的蓝移, 与蛋白结合后荧光增强的程度比与脂质结合的弱。微管蛋白有两个尼罗红的结合位点, 每个位点对荧光团的荧光寿命或外部淬灭系数都有明显的作用。它可用于流式细胞仪和显微镜分析泡沫细胞中动脉粥样硬化的形成及示踪神经细胞中脂小滴的快速轴突传递。N-1142 即 Nile red, 分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$, 分子量为 318.37, CAS 编号 7385-67-3。

3. NPN N-苯-1-萘胺 (NPN, P-65) 是阴离子探针 ANS (A-47) 的非极性类似物。在真菌菌丝上的对比研究表明, 它作为膜荧光探针优于 DPH 和 Nile Red。NPN 是脂双层中脂质移动性的敏感性探针, 能很好地定位在磷脂头端区域的下方, 此外还发现, NPN 在大肠杆菌膜囊泡中对代谢活性敏感。P-65 即 N-phenyl-1-naphthylamine, 分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}$, 分子量为 219.29, CAS 编号 90-30-2。

(三) 固醇类似物

目前可获得的 NBD- 和苝标记的胆固醇类似物是用荧光团替换了胆固醇可变的烷基尾片段后产生的。NBD 胆固醇类似物 (N-1148) 中环境敏感的 NBD 荧光团定位在膜内部, 与 NBD 标记的磷脂酰基链的异常位置不同。与其他 NBD 脂类类似物一样, 这些探针可用来研究脂类转运过程和脂质-蛋白质的相互作用。NBD 胆固醇可经净化剂 (scavenger) 受体被高密度脂蛋白选择性的摄取, 一种脂滴特异的蛋白可以相当高的亲和力 ($K_d = 2 \text{ nmol/L}$) 和未酯化的 NBD 胆固醇结合。PMC 油酸盐 (P-226) 已经用于标记低密度脂蛋白 (LDL) 来检测受体的结合和内化, 通过净化剂途径 (scavenger pathway) 用乙酰 LDL 可研究受体介导的入胞作用, 也可研究含有 LDL 受体的培养细胞的光敏作用。P-223 在高密度脂蛋白间的自发传递速率是苝酰基磷脂酰胆碱的 20 倍。有人认为苝胆固醇酯 C-212 和 C-213 可作为胰羧基酯水解酶和胆盐活性脂酶的荧光底物, 如苝胆固醇酯, BODIPY (C-3927) 胆固醇酯中的荧光团嵌进分子

的脂肪酸基部分,而不是在固醇核中,固醇酯为高度非极性,完全不能进行膜间的自发传递。这些核素是高密度和低密度脂蛋白的核心脂质成分。BODIPY 胆固醇酯可用于荧光显微术追踪胆固醇的转运和受体介导的脂蛋白的细胞内吞作用,也可作为一般的非交换的膜标志物。N-1148 即 22-(N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-23,24-bisnor-5-cholesterol, 分子式为 $C_{28}H_{38}N_4O_4$, 分子量为 494.63, CAS 编号/名称为 78949-95-8; P-226 即 1-pyrenemethyl 3-(cis-9-octadecenoyloxy)-22,23-bisnor-5-cholesterol (PMC oleate), 分子式为 $C_{57}H_{76}O_4$, 分子量为 825.22, CAS 编号/名称为 72535-39-8; C-212 即 cholesteryl 1-pyrenebutyrate, 分子式为 $C_{47}H_{60}O_2$, 分子量为 656.99; C-3927 即 cholesteryl 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-dodecanoate (cholesteryl BODIPY (r) FL C_{12}), 分子式为 $C_{50}H_{77}BF_2N_2O_2$, 分子量为 786.98。

(四) 环境敏感光谱位移膜探针

1. Prodan 和 Laurodan Weber 和 Farris 在 1979 年介绍的 prodan (P-248), 因为同时具有电子供体和电子受体的取代基, 因此具有大的激发态偶极力矩和很大的溶剂极性依赖性荧光位移 (图 23-9)。

已经制备了几种原始探针的变体 (variants), 包括亲脂性的衍生物 laurdan (D-250) 和巯基反应衍生物 acrylodan 和 badan (A-433、B-6057), 这些荧光团在生物交联物中具有环境敏感的性质。当 prodan 或它的衍生物掺入膜内后, 它们的荧光光谱对周围磷脂的物理状态敏感。在膜性结构, 尽管 Fourier 变换红外 (Fourier transform infrared, FTIR) 测量提示 Prodan 能在一定程度上插入脂质双层的内部, 但 prodan 似乎主要定位于膜表面。prodan 的激发态弛豫对磷脂碳氢化合物尾和甘油骨架间键的性质 (酯键或醚键) 敏感。相反, laurodan 激发态弛豫则不依赖于头部基因的类型, 而是由脂双层对水的渗透性决定。虽然两种探针名义上需要 UV 激发, 但双光子红外激发技术已经被成功运用于 prodan 和 laurdan, 其激发波长约为 360 nm。P-248 还可用于二维荧光相关光谱学研究。

P-248 即 6-propionyl-2-dimethylaminonaphthalene (prodan), 分子式为 $C_{15}H_{17}NO$, 分子量为 227.31, CAS 编号/名称为 70504-01-7; D-250 即 6-dodecanoyl-2-dimethylaminonaphthalene (laurdan), 分子式为 $C_{24}H_{35}NO$, 分子量为 353.55, CAS 编号/名称为 74515-25-6; A-433 即 6-acryloyl-2-dimethylaminonaphthalene (acrylodan), 分子式为 $C_{15}H_{15}NO$, 分子量为 225.29, CAS 编号/名称为 86636-92-2; B-6057 即 6-bromoacetyl-2-dimethylaminonaphthalene (badan), 分子式为 $C_{14}H_{14}BrNO$, 分子量为 292.17。

根据它们特征性的荧光光谱, 已经探索使用这些探针来鉴定共存的脂类结构域, 这种方法本质上与双波长比率测量近似, 其他的应用包括检测非双层脂质相, 胆固醇和乙醇诱导的膜结构的映象变化 (mapping change), 评价脂类/水界面的极性。Prodan 荧光团还可检测含胆固醇膜的表面性质, 象 ANS 一样, prodan 也可用作蛋白质的非共价相互作用探针。

2. Dapoxyl 衍生物 Dapoxyl 氨基磺酰衍生物显示 UV 吸收, 最大吸收波长约 370 nm, 消光系数 $> 24\,000\text{ cm}^{-1}\cdot\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在极性溶剂内, Dapoxyl 氨基磺胺 Stokes 位移超过 200 nm (图 23-10)。在非极性环境中, 发射光谱变为有结构的。并位移到较短波长 (见图 23-11)。Dapoxyl 丁基氨基磺胺 (D-12801) 是一种中性可插入膜内的探针, 而 Dapoxyl 磺酸 (D-12800) 则定位于膜的水性界面, Dapoxyl 探针的反应性变型在相应部分叙述。D-12801 即 Dapoxyl (r) butylsulfonamide, 分子式为 $C_{21}H_{25}N_3O_3S$, 分子量为 399.51; D-12800 即 Dapoxyl (r) sulfonic acid, sodium salt, 分子式为 $C_{17}H_{15}N_2NaO_4S$, 分子量为 366.37, CAS 编号/名称为 152278-00-7; D-10460 即 Dapoxyl (r) (2-aminoethyl) sulfonamide, 分子式为 $C_{19}H_{22}N_4O_3S$, 分子量为 386.47。

3. 苯氨基萘磺酸盐 (ANS) 和相关衍生物 苯氨基萘磺酸盐作为荧光探针的使用可追溯到 20 世纪 50 年代 Weber 的开拓性工作, 到目前为止, 这类探针仍是用于膜表面和蛋白研究有价值的探针。1982 年 Slavik 对这类探针的性质进行了综述, 建议进行阅读, 尤其注意其中的光谱数据。其主要成员是 1,8-ANS (A-47) 及其类似物 2,6-ANS (A-50) 和 2,6-TNS (T-53), 它们在水中基本无荧光, 只有结

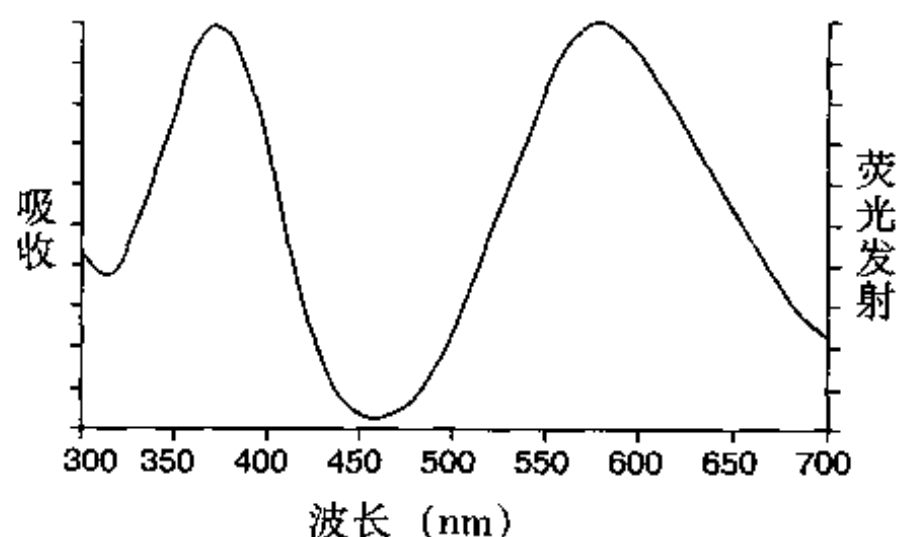


图 23-10 甲醇中 Dapoxyl 氨乙基氨苯磺胺【Dapoxyl (2-aminoethyl) sulfonamide, D-10460】的吸收和荧光发射光谱

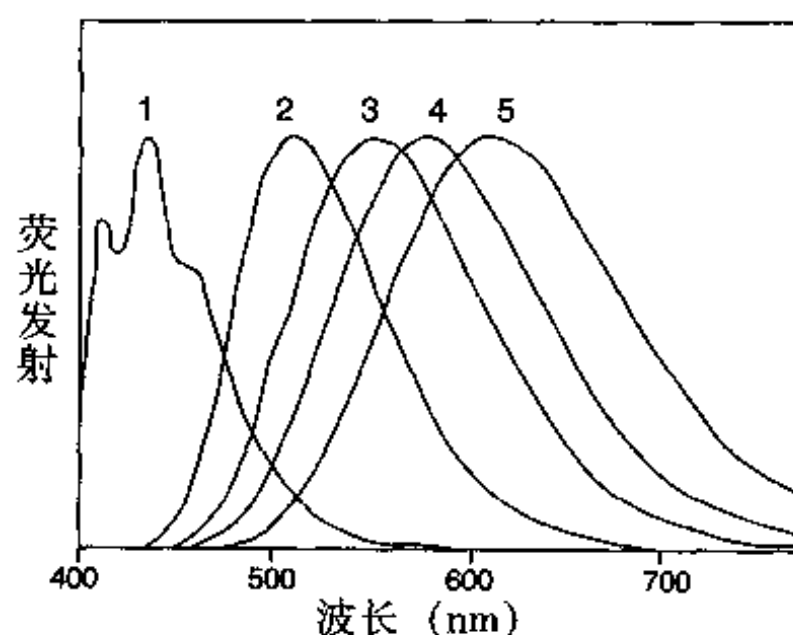


图 23-11 不同溶剂中 Dapoxyl 氨乙基氨苯磺胺【Dapoxyl (2-aminoethyl) sulfonamide, D-10460】的标准荧光发射光谱。1: 己烷; 2: 氯仿; 3: 丙酮; 4: 乙腈; 5: 1:1 乙腈/水

合到膜上才会有明显的荧光 (量子产率约为 0.25), 当与蛋白结合后荧光增强 (量子产率约为 0.7), 此特点使得它们成为研究蛋白折叠、构象变化的敏感指示剂, 为研究金属离子和谷氨酸合成酶结合以及确定 H^+ -ATP 酶和磷脂酶激酶的活性提供了方法。2, 6-ANS 的荧光可被环糊精增强, 因此是一种用毛细管电泳分离和分析环糊精的敏感方法。

双-ANS (B-153) 用作蛋白质非极性空穴的探针比 1, 8-ANS 优越。双-ANS 对某些蛋白质的核苷酸结合位点有特别高的亲和性, 也被用作微管蛋白的结构探针并可作为微管装配的一种抑制剂。已经有报道双 ANS 可共价掺入蛋白质。

4. 苯乙烯衍生物 苯乙烯衍生物 DCVJ (D-3923) 是一种微管蛋白装配和肌动蛋白聚合的敏感指示剂, DCVJ 的荧光量子产率强烈依赖于环境的刚性, 当染料与抗体结合后, 其荧光强度有较大增强; 当以合成性多聚体或在磷脂膜内部时, 荧光强度也增强, DCVJ 已经用于磷脂双分子层的微粘性测量。D-3923 即 4-(dicyanovinyl) julolidine (DCVJ), 分子式为 $C_{16}H_{15}N_3$, 分子量为 249.31。

5. 4-氨基-4'-苯甲酰氨基二苯乙烯-2, 2'-二磺酸 (4-Amino-4'-Benzamidostilbene-2, 2'-Disulfonic Acid) 4-氨基-4'-苯甲酰氨基二苯乙烯-2, 2'-二磺酸二钠盐 (MBDS 或 BADS, A-11760) 在水中有比 ANS 低得多的残留荧光, 与某些蛋白质的疏水的口袋结合后, 其荧光强度可显著增强, 与人血清白蛋白形成 1:1 复合物后, MBDS 的荧光强度几乎增强 100 倍, 因此可以用于血清白蛋白定量。该复合物还可作为红细胞带 3 蛋白和其他阴离子运输蛋白的抑制剂。A-11760 即 4-amino-4'-benzamidostilbene-2, 2'-disulfonic acid, disodium salt (MBDS), 分子式为 $C_{21}H_{16}N_2Na_2O_5S_2$, 分子量为 518.47, CAS 编号/名称为 40301-06-2。

6. 非极性苝和 NBD 探针 非极性双苝烷 (B-162、B-311) 由分别与十个或三个亚烷基交联的两个苝部分组成。1, 3-双-(1-苝) 丙烷 (B-311) 有两个苝部分通过一个三碳的亚烷基间隔区相联结组成, 这种探针激发态二聚体的形成, 与双苝基磷脂有某种程度的类似, 因此, 荧光发射波长受到分子内而非两分子间相互作用的控制。这些探针对环境高度敏感, 因此可用作脂蛋白内部区域、膜、微胶粒 (micelles, 分子团)、液态晶体、合成聚合体的粘度传感器。因为激发态二聚体的形成引起光谱位移, 因此该探针可用于分子移动性的比率成像。由于细胞对 B-311 的摄取是有限的, 因此苝脂肪酸更适用于此目的。B-311 激发态分子的形成成为温度依赖性, 探针可用做荧光温度计, 能检测到的温度高达 400°C 。

然而, 用于同样目的的苝脂肪酸似乎比该探针更好, 因为细胞摄取 1, 3-双-(1-苝基) 丙烷有限。1-苝丁醇 (P-244) 可用作中性膜探针, 并可用于合成新的苝标记探针, 也可用于髓白血病细胞的光蚀术 (photoablation)。非极性探针 NBD 二-十六胺 (dihexadecylamine, D-69) 主要用于 TLC 分离脂类的

荧光检测。B-311 即 1, 3-bis- (1-pyrenyl) propane, 分子式为 $C_{35}H_{24}$, 分子量为 444.57, CAS 编号/名称为 61549-24-4; B-162 即 1, 10-bis- (1-pyrene) decane, 分子式为 $C_{42}H_{38}$, 分子量为 542.76, CAS 编号/名称为 61549-31-3; P-244 即 1-pyrenebutanol, 分子式为 $C_{20}H_{18}O$, 分子量为 274.36, CAS 编号/名称为 67000-89-9; D-69 即 4-dihexadecylamino-7-nitrobenz-2-oxa-1, 3-diazole (NBD dihexadecylamine), 分子式为 $C_{38}H_{68}N_4O_3$, 分子量为 628.98。

7. 亲脂性的香豆素探针 4-十七碳烯酰-7-羟基香豆素 (4-Heptadecyl-7-hydroxycoumarin, H-22730) 和 6, 8-二氟-4-十七碳烯酰-7-羟基香豆素 (C_{17} DiFU, D-12760) 是 pH 敏感的蓝色荧光 7-羟基香豆素 (伞形酮, umbelliferone) 的烷基衍生物, 与其他的亲脂性的香豆素一样, H-22730 和 C_{17} DiFU 主要用作膜表面的探针。7-羟基的去质子化对膜表面静电电位有强依赖性, 与 H-22730 相比, C_{17} DiFU 有更酸性的敏感范围。在阳离子去垢剂 CTAB 中 pKa 为 6.35, 在阴离子去垢剂十二烷基硫酸钠 (SDS) 中为 11.15。已经确定掺入 DOPC 囊膜的 C_{17} DiFU, 其 pKa 约为 6.1。然而, 在脂质集合体 (lipid assemblies) 中, 其 pKa 对膜表面的离子组成有强依赖性, 因此是膜表面静电电位敏感性探针。H-22730 已经用来测定分离的正常和多药耐药性鼠白血病细胞的细胞膜在膜接触面上 pH 的差别, 也可作为研究磷脂双分子层头部区域的探针。H-22730 的分子式为 $C_{26}H_{40}O_3$, 分子量为 400.60, CAS 编号 26038-83-5; D-12760 即 6, 8-difluoro-4-heptadecyl-7-hydroxycoumarin (C_{17} DiFU), 分子式为 $C_{26}H_{38}F_2O_3$, 分子量为 436.58。H-22730 主要用做膜表面 pH 的指示剂, 这种指示剂的反应比自由溶剂指示剂如 BCECF 或 SNARF 要复杂得多。

(五) 两性离子探针

与其他中性探针不同的是两性离子探针的极性很高, 故有不同的性能。氨基苯乙烯基探针与 D-291 一样, 由硫代丙基取代了甲基末端, 取代基增加的电荷阻止了探针的内在化。探针在水溶剂中无荧光, 当掺入膜中后其吸收光可发生蓝色位移。

丹磺酰赖氨酸可能对膜结构有某种程度的选择性, 是一种可在体内和体外对热诱导的细胞杀伤作用和热耐受作用进行分析的新探针。它还能与 FITC (F-143) 和 Hoechst33342 (H-1399) 一起使用, 同时检测抗原表达及对热敏感和具有抵抗作用细胞群的 DNA 成分。

(六) Pd (QS)₂: 在活细胞中可还原脂质的一种催化剂

Joo F 等将钯二钠茜素单磺酸盐 Pd (QS)₂ 用于测定分离的生物膜和活细胞膜脂质的氢化作用, 水溶性的复合物选择性地还原活细胞中的脂肪酸双键, 可降低膜的流动性并抑制细胞的成熟, 因此, 催化剂可用于检查细胞膜的生化功能和物理性质间的关系。

(七) 其他类型的膜探针

与相应的脂肪酸比较, 过氧化物酶体缺陷细胞对苾壬醇 (P-394) 的摄取和生物合成掺入相对受到抑制, 可用来筛选过氧化物酶体缺陷的突变, 二-十六胺 NBD (D-69) 主要用在磷脂的光谱检测。P-394 即 1-pyrenenonanol, 分子式为 $C_{25}H_{28}O$, 分子量为 344.50。

第三节 细胞器探针

动物细胞的主要组成成分如彩图 9 所示, 主要的细胞器包括内质网 (滑面和粗面)、高尔基复合体、线粒体、溶酶体、微管、微丝、小泡等。

分子探针公司提供了大量细胞通透性的荧光染料, 可选择性地标记活细胞的线粒体、溶酶体、内质网和高尔基复合体。包括特异标记线粒体的 MitoTracker、MitoFluor, 标记溶酶体的 LysoTracker、LysoSensor、RedoxSensor 和标记内质网的 ER-Tracker 等染料, 这些染料实质是一类能渗透到细胞内, 并能选择性地与细胞中的细胞器结合的荧光物质, 即细胞器荧光探针。

这些探针适合大多数的荧光测试设备进行检测,因此给研究者研究呼吸作用、有丝分裂、凋亡、多药抗性、底物降解和解毒作用、细胞内的转运和分检等提供了一种强大的工具,而且,与抗体不同,这些荧光探针可用来研究活细胞的细胞器结构和活性,对细胞功能的影响却十分轻微,采用红色荧光的活细胞细胞器染料来显示绿色荧光蛋白(GFP)和细胞器的共存尤其有用。Aridor 和 Hannan 有一篇优秀的综述,详细总结了那些通过溶酶体、高尔基复合体和内质网影响细胞内转运过程的人类疾病。其他有关细胞器的一般综述文献可通过访问下列网址获得,网址为 <http://cellbio.utmb.edu/cellbio/>。

荧光探针选择性地与线粒体、溶酶体、内质网和高尔基体结合,再利用激光扫描共聚焦显微镜观察,在得到这些细胞器高分辨率清晰图像的同时,还可以动态观察活细胞的形态学变化,结合免疫组化、原位杂交技术和体视学分析等新技术新方法,可以从分子生物学水平定量研究细胞的病理和生理变化,还可以用来分析细胞的能量代谢、物质合成和转运、膜电位的变化以及鉴别细胞类型。不同的细胞器因其形态结构及功能不同,所要求的探针也不尽相同,而同一种细胞器又常有几种探针并各具特点。

分子探针公司还可提供一系列细胞器特异的单克隆抗体,可用于哺乳动物和酵母细胞的免疫定位、免疫沉淀和 Western 印迹分析。针对五种线粒体氧化磷酸化复合物的抗体提供了一种独特的了解线粒体装配和功能的工具。彩图 11 表示线粒体氧化磷酸化系统主要的蛋白复合物和识别它们的抗体。

一、线粒体探针

(一) 线粒体的形态结构及功能

线粒体为线状、长杆状、卵圆形或圆形小体,外被双层界膜。外界膜平滑,内界膜则折成长短不等的嵴并附有基粒。外膜较厚,约 7 nm,内膜较薄,约 6 nm。内外界膜之间为线粒体的外室,与嵴内隙相连,内界膜内侧为内室(基质室),内室中充满颗粒状的线粒体基质。内外界膜的通透性不同,外界膜的通透性高,可允许多种物质通过,而内界膜则构成明显的通透屏障,使一些物质如蔗糖和 NADH 全然不能通过,而其他物质如 Na^+ 和 Ca^{2+} 等也只有借助于主动运输才能通过。线粒体的基质含有电子致密的无结构颗粒(基质颗粒),与二价阳离子如 Ca^{2+} 及 Mg^{2+} 具有高度亲和力。基质中进行着 β 氧化、氧化脱羧、枸橼酸循环以及尿素循环等过程。在线粒体的外界膜内含有单胺氧化酶以及糖和脂质代谢的各种转移酶;在内界膜上则为呼吸链和氧化磷酸化的酶类。线粒体的形态和数量随细胞的类型、细胞代谢水平和细胞所处的细胞周期及增殖状态的不同有所差异,在褐色脂肪组织细胞、肝细胞和某些肾上管上皮细胞含有丰富的有活性的线粒体,而静息的免疫系统祖细胞或前体细胞内,线粒体一般很少。在 Alzheimer 病,线粒体的数量减少,它们的蛋白和核酸受到反应性氧基的影响,包括一氧化氮。关于线粒体研究的现状可参阅发表在 Science 上出色的综述(Science, 1999; 283: 1475~1497)。在合成甾类激素的内分泌细胞(如肾上腺皮质细胞、卵甾滤泡细胞、睾丸的 Leydig 细胞等),线粒体嵴呈小管状,心肌细胞的线粒体嵴排列很不规则。

线粒体是蛋白合成、组装和运输的场所,对钾、钠、镁有特定的转运机制。线粒体还是细胞的供能站,其基本粒子上含有丰富的酶系统,包括磷酸化酶、细胞色素酶、琥珀酸脱氢酶、ATP 酶等。ADP 在磷酸化酶的作用下与焦磷酸结合生成 ATP,ATP 在水解酶的作用下释放出能量,供细胞利用,以完成蛋白质和核酸合成、物质转运和细胞分泌及分裂等功能。

(二) 线粒体的荧光探针

线粒体是细胞内负责需氧代谢的细胞器,在细胞凋亡中也起着关键作用。大多数线粒体选择性探针的摄取依赖于线粒体的膜电位,而壬基吡啶橙、MitoTracker Green FM 和 MitoFluor Green 探针是例外,这几种探针摄取膜电位的的关系还不明确。线粒体选择性的试剂使研究人员可以检测线粒体的活性、进行线粒体定位和定量,并可以监测某些药理学试剂的作用,如改变线粒体功能的麻醉剂的作用。另外还有许多细胞通透性的线粒体探针和针对氧化磷酸化(OxPhos)系统的亚基特异性的单克隆抗体,将在后面进行详细讨论。

1. 可固定的线粒体选择性探针 尽管常规的线粒体荧光染料, 如罗丹明 123 和 tetramethylrhodamine 可很容易地被有活性功能的线粒体摄取, 但一旦线粒体膜电位消失则容易从细胞内洗脱。在那些必须经醛基固定剂或其他影响线粒体能量状态的试剂处理的细胞, 就无法使用这类探针。MitoTracker 探针可克服这种缺点, 这些线粒体特异性的探针可被有活性的线粒体浓集并且在细胞固定后很好保存。因为 MitoTracker Orange 和 MitoTracker Red 也能在固定后保持不变, 因此在随后的处理过程中 (如进行免疫组织化学染色、原位杂交或电镜处理), 可保持活细胞状态下的荧光染色特点。另外, MitoTracker 试剂可免除使用致病性细胞进行研究的缺点, 当线粒体染色后, 即在分析前可用固定剂处理细胞。

MitoTracker 探针是细胞通透性的线粒体选择性染料, 含有柔和的巯基反应性氯甲基成分, 氯甲基对于固定后保持染料和线粒体结合非常重要。标记线粒体时, 可用微摩尔以下的 MitoTracker 探针孵育细胞, 经被动扩散穿过细胞膜并在有活性的线粒体内积聚。一旦线粒体标记后, 细胞即可用醛基固定剂固定使标本进一步硬化。但使用 MitoTracker Green FM 时, 应用冷丙酮固定, 否则会造成染色结果的不准确。分子探针公司可提供七种 MitoTracker 试剂, 它们具有不同的光谱特性、氧化状态和可固定性 (表 23-12)。MitoTracker 探针也有 20 支包装的类型, 每支为 50 μg 。

表 23-12 MitoTracker 探针的光谱特征

产品编号	MitoTracker 探针	吸收波长 * (nm)	发射波长 * (nm)	氧化状态
M-7514	MitoTracker Green FM	490	516	未确定
M-7510	MitoTracker Orange CMTMRos	551	576	氧化型
M-7511	MitoTracker Orange CM-H ₂ TMRos	551	576	还原型
M-7512	MitoTracker Red CMXRos	578	599	氧化型
M-7513	MitoTracker Red CM-H ₂ XRos	578	599	还原型
M-22425	MitoTracker Red 580	581	644	未确定
M-22426	MitoTracker Deep Red 633	644	665	未确定

* 甲醇中测定的最大荧光吸收和荧光发射波长, 在细胞环境中数值可能不同。MitoTracker Green FM 在水性环境无荧光。这些还原性的 MitoTracker 探针直到氧化后才有荧光。

(1) 橘黄色、红色、红外区荧光 MitoTracker 探针 这些探针包括橘黄色的 MitoTracker 衍生物荧光探针 tetramethylrhodamine (MitoTracker Orange CMTMRos, M-7510)、红色荧光探针 X-rosamine (MitoTracker Red CMXRos, M-7512)、最新的红色衍生物 MitoTracker Red 580 和 MitoTracker Deep Red 633 (M-22425, M-22426)。MitoTracker Red、Red 580 和 Deep Red 633 产生长波长荧光, 可很好地与绿色荧光染料区分, 因此适合进行荧光多标记实验。MitoTracker 还原型探针有 (MitoTracker Orange CM-H₂TMRos, M-7511) 和 (MitoTracker Red CM-H₂XRos, M-7513), 与 MitoTracker Orange CMTMRos 和 MitoTracker Red CMXRos 不同, 这些探针的还原型不发荧光, 只有进入有呼吸活性的细胞, 才能被氧化成荧光性的线粒体选择性探针, 然后被线粒体摄取。MitoTracker 探针的用途如下: ①分析非洲蟾蜍属中激动素样 (kinesin-like) 蛋白对生殖细胞原浆聚集的作用; ②在凋亡时细胞线粒体跨膜电位变化明显, 因此可用来检测早期的细胞凋亡; ③识别酵母菌线粒体形态; ④使用全内部反射 (TIR) 显微荧光测定法 (total internal reflection microfluorimetry) 检查入集合管细胞系细胞肿胀的时程; ⑤定位一种新的涉及线粒体沿着微管转运的 kinesin 运动蛋白; ⑥同时观察来自 GFP 融合蛋白和 MitoTracker 染料的荧光信号; ⑦研究用野生型和突变型 kinesin 重链 cDNA 转化的成纤维细胞线粒体的定位; ⑧在描述 *Aplysia californica* 囊细胞神经元钙通道和 Vero 细胞的 verotoxin B 亚基的亚细胞分布特征时, 观察线粒体的分布特点。

(2) MitoTracker Orange CMTMRos 和它的还原型 CM-H₂TMRos 已经用于研究 *Pneumocystis carinii* 线粒体的新陈代谢状态, 固定后, tetramethylrhodamine 和 X-rosamine MitoTracker 染料的氧化型可通过荧光直接检测, 也可用抗 tetramethylrhodamine 或 Texas Red 染料的抗体 (A-6379、A-6399) 进行检测。

(3) MitoTracker Green FM 细胞线粒体用纳摩尔浓度的 MitoTracker Green FM (M-7514) 进行染色, 显示出亮绿色荧光素样荧光。MitoTracker Green FM 另外的优点是在水中无荧光, 只有在线粒体的脂质环境中聚集时才产生荧光, 因此, 背景荧光可以忽略, 使研究人员在加入染料后立刻就能看到线粒体, 不必进行洗涤步骤。

与 MitoTracker Orange CMTMRos 和 MitoTracker Red CMXRos 不同, 不管线粒体膜电位如何, MitoTracker Green FM 似乎优先积聚于线粒体, 因此是确定线粒体数量的有用工具。此外, MitoTracker Green FM 本质上比广泛应用的荧光染料 rhodamine 123 的光稳定性更好, 在较低的浓度即可产生更明亮、更好的线粒体选择性的信号。因为它的最大发射波长与罗丹明 123 相比, 蓝移近 10 nm, 因此, MitoTracker Green FM 在荧光双标记实验中可获得更好的分辨。MitoTracker Green FM 的应用: ①分析 *Trypanosoma brucei* 血流形成, 进行荧光多标记成像; ②通过卵白素、链亲和素和抗生物素抗体显示线粒体选择性的标记; ③确定 CHO 细胞线粒体定位; ④确定在受精和随后的胚胎发育中精子线粒体的命运; ⑤在表达 Tau 的 CHO 细胞监测线粒体的分布和转运; ⑥通过线粒体研究 T 淋巴细胞钙信号的调节。

2. MitoFluor 探针: 不可固定的线粒体选择性探针

(1) MitoFluor Red 594 和 MitoFluor Far Red 680 为两种线粒体膜电位传感性探针, 其荧光发射波长较长。MitoFluor Red 594 (M-22422) 是一种线粒体电位传感器, 最适合 594 nm 的 He-Ne 激光激发, 这种长波长探针对于同时检测绿色荧光标记物、其他的位点选择性探针和绿色荧光蛋白嵌合体尤其有用, 因为它提供了一种 600 nm 以下的光谱窗口。MitoFluor Far Red 680 (M-22423) 也称为罗丹明 800, 也是一种线粒体电位传感器, 其吸收和发射波长在近红外区。MitoFluor Far Red 680 被有活性的线粒体积聚后, 其吸收和荧光发射光谱产生轻度红移, 同时其荧光强度显著降低, 虽然这种反应肉眼不能直接观察到, 但使用红外光敏感的检测器如 CCD 照相机即可获取。这种长波长的探针在下述情况下使用有明显优点: 组织、血液和其他生物液, 因为这些标本在较短的波长激发时, 可产生高的吸光度或自发荧光。M-22422 即 MitoFluor Red 594, 分子式为 $C_{35}H_{33}ClF_6N_2O$, 分子量为 647.10; M-22423 即 MitoFluor Far Red 680, 分子式为 $C_{26}H_{26}ClN_3O_5$, 分子量为 495.96, CAS 编号/名称为 137993-41-0。

(2) MitoFluor Red 589 MitoFluor Red 589 (M-22424) 在线粒体的积聚与膜电位无关, 因此可用于活细胞和固定细胞的线粒体染色。探针的吸收和发射峰值分别为 588 nm 和 622 nm, 可使用适合 Texas Red 染料的普通滤光片组观察。与其他 MitoFluor Red 探针一样, MitoFluor Red 589 也可与绿色荧光探针一起使用, 用于荧光双标记研究。M-22424 即 MitoFluor Red 589, 分子式未确定, 分子量约为 550。

(3) MitoFluor Green MitoFluor Green (M-7502) 与 MitoTracker Green FM 结构相似, 缺少它的反应性氯甲基成分, 在固定后不能很好留存。与 MitoTracker Green FM 一样, MitoFluor Green 可选择性地染色活细胞和固定细胞的线粒体。MitoFluor Green 比 rhodamine 123 的光稳定性好, 在较低的浓度就可产生更明亮、线粒体选择性信号更好的荧光。相对于 rhodamine 123 最大发射光谱产生蓝移, 因此与红色荧光探针一起用于双标记实验可获得更佳的分辨率。

3. RedoxSensor Red CC-1 染料 RedoxSensor Red CC-1 (R-14060) 染料是一种独特的探针, 它的荧光定位似乎是基于细胞胞质液的氧化还原电位。已经发现 RedoxSensor Red CC-1 染料可被动进入活细胞。一旦进入细胞, 无荧光的探针既可在胞质液中氧化为红色荧光产物 (最大激发/发射波长约 540/600 nm), 随后在线粒体中积聚, 也可转运到溶酶体后在溶酶体中氧化, 氧化产物在线粒体和溶酶体之间的分布差别取决于胞质液的氧化还原电位。在增生的细胞, 线粒体染色占主导地位, 而接触抑制的细胞, 主要是溶酶体着色。已经发现定量氧化产物分布的最好方法是联合使用线粒体选择性的 MitoTracker Green FM (M-7514) 和 RedoxSensor Red CC-1 染料。

4. JC-1 和 JC-9: 双发射电位敏感性探针 绿色荧光的 JC-1 (5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethyl benzimidazolyl carbocyanine iodide, T-3168) 在低浓度或低膜电位情况下以单体形式存在,

但在较高的浓度 ($0.1 \mu\text{mol/L}$ 以上的水溶液) 或较高的电位条件下, JC-1 形成红色荧光的 J 聚体 (J-aggregates), 最大激发和发射光谱波长约为 590 nm 。因此, 这种碳花青染料的发射波长可用作线粒体膜电位测定的敏感探针。通过组合来自绿色荧光 JC-1 单体 (水中的最大吸收/发射波长约 $510/527 \text{ nm}$) 和 J-聚体 (最大发射波长 590 nm) 的信号, 可进行不同类型的比率测量, 可被波长介于 485 nm 和 585 nm 之间的光线有效地激发。红/绿 JC-1 荧光比率仅依赖于膜电位而与影响其中单一成分荧光强度的其他因素无关, 如线粒体大小、形状和密度。JC-1 单体可用荧光黄滤光片观察, 而 J-聚体则可用观察四甲基罗丹明的滤光片, 两种探针也可同时使用标准荧光黄长波通 (longpass) 光学滤片组进行观察。Chen 及其同事采用比率测量技术, 使用 JC-1 研究了活细胞的线粒体膜电位。JC-1 的其他用途包括: ① 用流式细胞术分析药效; ② 检测人类脑肌病; ③ 追踪细胞凋亡过程中线粒体的变化; ④ 研究线粒体的中毒、解偶联和缺氧; ⑤ 监测椭圆玫瑰树碱对线粒体电位的作用。

JC-1 是检测活细胞线粒体膜电位最合适的探针。有人曾用亲脂性阳离子探针 (如罗丹明 123) 检测活细胞中线粒体膜电位, 并取得突破性进展, 发现不同类型的细胞线粒体膜电位不同, 例如: 心肌细胞的线粒体膜电位很高, 而膀胱上皮细胞的线粒体膜电位很低; 不同的癌细胞线粒体膜电位也不同, 例如: 腺癌细胞的线粒体膜电位高, 而燕麦细胞癌细胞线粒体膜电位低, 这些发现打破了曾被普遍接受的不同种类的哺乳动物细胞的线粒体膜电位相同的观念。但用亲脂性阳离子探针还有许多解决不了的问题, 例如: 是否同一个细胞的线粒体都带有相同的膜电位? 同一个线粒体上各区域的膜电位是否相同? 利用 JC-1 探针就能解决这些问题。用 $10 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 JC-1 于 37°C 条件下, 在培养基中染色活细胞 10 min 后, 用激光扫描共聚焦显微镜观察, 此时观察到红色及绿色两种荧光; 如改用长波通滤片组再观察, 则可见红绿混合成的橙色荧光。绿荧光表示 JC-1 单体, 而红荧光表示 J 聚体, J-聚体的形成有赖于能到达线粒体的 JC-1 的浓度及细胞外 JC-1 的浓度。人肿瘤细胞在 JC-1 浓度为 $1.24 \mu\text{mol/L}$ 中培养 10 min , J-聚体形成很少, 而当浓度为 $2.3 \mu\text{mol/L}$ 以上, 则 J-聚体形成很多。这说明 JC-1 的浓度是 J-聚体形成的另一主要影响因素。有人曾用 $10 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 JC-1 在培养基中染色几种不同的哺乳动物活细胞, 10 min 后多数细胞内都可见两种不同荧光着色的线粒体, 一种呈单纯绿色, 一种呈橙色, 并发现某些细胞中同一个线粒体上可出现某些区域呈绿色荧光, 而有些区域呈橙色荧光。其机制可能是由于线粒体膜上的 Ca^{2+} 分布不平衡, 有的区域由于 Ca^{2+} 泵要摄取游离的 Ca^{2+} 而耗能, 导致此区域的膜电位较低呈绿色荧光, 相反, 有些区域无需这种耗能过程, 膜电位相对较高而呈橙色荧光, 这对线粒体膜电位的定量研究很有价值。

JC-1 和其他试剂如 LIVE/DEAD 精子生存力检测试剂盒 (L-7011) 结合使用, 采用流式细胞术可同时评价细胞的完整性和线粒体的功能。已经发现另一种线粒体标志物 JC-9 (3, 3'-dimethyl- β -naphthoxazolium iodide, D-22421) 具有非常不同的化学结构, 但同样具有电位依赖的光谱学的性质。然而, JC-9 的绿色荧光基本上不随膜电位发生改变, 而红色荧光在膜电位超极化的情况下荧光强度显著增强。T-3168 即 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide [JC-1; CBIC₂ (3)], 分子式 $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{Cl}_4\text{IN}_4$, 分子量为 652.23 , CAS 编号 $47729-63-5$; D-22421 即 3, 3'-dimethyl- β -naphthoxacarbocyanine iodide [JC-9; DiNOC1 (3)], 分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{21}\text{IN}_2\text{O}_2$, 分子量为 532.38 。

5. 线粒体选择性的罗丹明和 Rosamine

(1) 罗丹明 123 罗丹明 123 (R-302、R-22420) 是一种细胞通透性的、阳离子的荧光探针, 容易被有活性的线粒体摄取, 没有细胞毒性。与其他染料如 DASPMI 相比, rhodamine 123 的摄取和平衡非常迅速 (常在几分钟内完成), 而 DASPMI 则需 30 min 或更长。可用荧光黄长波通 (longpass) 光学滤光片观察, 罗丹明 123 染色的线粒体呈现黄绿色; 使用四甲基罗丹明长波通光学滤光片观察时, 同样的线粒体则为红色。与亲脂性的罗丹明和碳花青探针不同, 罗丹明 123 显然对内质网不染色。罗丹明 123 应用较广泛, 如突触前神经末梢、活细菌、植物和人类精子。使用流式细胞术, 采用 rhodamine 123 可挑选呼吸缺陷的酵母细胞, 而且还可用于分离那些对促细胞分裂剂刺激有反应的淋巴细胞。罗丹明 123

的其他用途还包括：①细胞凋亡研究；②线粒体的轴浆运输；③细菌的生存力和活力；④线粒体酶的活性；⑤线粒体跨膜电位和其他的膜活动；⑥多药抗性；⑦分枝杆菌药物敏感性；⑧卵母细胞成熟。

尽管罗丹明 123 通常在细胞洗涤后不能留存，但许多人类癌细胞系通常可留存染料达 24 h 以上，而肉瘤或白血病细胞则不行，因此，罗丹明 123 可作为一种潜在的抗癌剂用于光动力学的治疗。罗丹明 123 优先被癌细胞的线粒体摄取和留存，并可抑制癌细胞的增殖，心肌细胞也可留存罗丹明 123 数天。

(2) 四溴罗丹明 123 (Tetrabromorhodamine 123) 四溴罗丹明 123 (T-7539) 为罗丹明 123 的溴化类似物，也是一种用于光动力学治疗的有用工具。罗丹明 123 是一种相当弱的光毒剂 (phototoxin)，对于单态氧 ($^1\text{O}_2$) 产生的光量子产率 <0.01 ，罗丹明 123 染色的细胞连续的照明可引起线粒体的碎裂，可能是由于活性氧的释放造成的。四溴罗丹明 123 是一种更有效的 $^1\text{O}_2$ 产生器，光量子产率为 0.7。尽管它严格定位于细胞的线粒体，但四溴罗丹明 123 对癌细胞有较强的光毒性，其光合产物 (photoproduct) 可很好留存。四溴罗丹明 123 不能染色活细胞细胞核，但是，在溶液中可与 DNA 结合，因此在微秒的时间刻度上可作为 DNA 内部柔韧性的探针使用。T-7539 即 2', 4', 5', 7'-tetrabromorhodamine 123 bromide，分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{13}\text{Br}_4\text{N}_2\text{O}_3$ ，分子量为 740.87。

(3) Rosamines 和其他罗丹明衍生物 其他线粒体选择性探针包括 tetramethylrosamine (T-639)，与荧光黄用于多色荧光标记可获得良好的对比度，罗丹明 6G (R-634)，其最大吸收波长界于罗丹明 123 和 tetramethylrosamine 之间。Tetramethylrosamine 和罗丹明 6G 都可用来检测多药抗性细胞的 P-糖蛋白介导的药物排除效率。罗丹明 6G 用来研究微血管再灌注损伤，也可用来研究嗜热无芽孢杆菌 PS3 TF1-ATPase 的刺激和抑制。T-639 即 tetramethylrosamine chloride，分子式为 $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{OCl}$ ，分子量为 378.90，CAS 编号/名称为 6837-70-3；R-634 即 rhodamine 6G chloride，分子式为 $\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_3$ ，分子量为 479.02，CAS 编号/名称为 989-38-8。

低浓度时，某些亲脂性的罗丹明染料可选择性地染色活细胞线粒体，低浓度的罗丹明 B 己酯 (R_6 ，R-648) 可选择性地积聚于线粒体，而且相对无毒性，酵母线粒体染色样品试剂盒 (Y-7530) 中就选用的这种染料。在高浓度时，罗丹明 B 己酯和罗丹明 6G 可染色动物细胞内质网。R-648 即 rhodamine B, hexyl ester, perchlorate (R_6)，分子式为 $\text{C}_{34}\text{H}_{43}\text{ClN}_2\text{O}_7$ ，分子量为 627.18。

已经发现四甲基罗丹明甲酯和乙酯 (TMRM, T-668; TMRE, T-669) 在线粒体和内质网的积聚决定于膜电位，而且，因为它们还原性的疏水特点，因此这些探针与细胞的结合显示出膜电位非依赖性的特征，比罗丹明 6G 的结合低 10~20 倍。四甲基罗丹明乙酯是进行动态荧光测定和原位定量测量的最好染料，比罗丹明 123 要好，因为它被活细胞的摄取是迅速和可逆的。TMRM 和 TMRE 已经用于测定与胞质液 Ca^{2+} 瞬变相关的线粒体去极化，并可对时间依赖的线粒体膜电位进行成像。使用 TMRE 和低亲合性 Ca^{2+} 指示剂 fluo-5N (F-14204) 可用来筛选线粒体通透性转换时转换孔 (transition pore) 开放的抑制剂。利用 TMRM、TMRE 和罗丹明 123 在膜电位驱动的线粒体摄取后产生红移的优点，已经发展了一种定量膜电位的比率测量技术。T-668 即 tetramethylrhodamine, methyl ester, perchlorate (TMRM)，分子式为 $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{ClN}_2\text{O}_7$ ，分子量为 500.93，CAS 编号 115532-50-8；T-669 即 tetramethylrhodamine, ethyl ester, perchlorate (TMRE)，分子式为 $\text{C}_{26}\text{H}_{27}\text{ClN}_2\text{O}_7$ ，分子量为 514.96，CAS 编号/名称为 115532-52-0；F-14204 即 fluo-5N, AM，分子式为 $\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{F}_2\text{N}_3\text{O}_{25}$ ，分子量为 1127.92。

(4) 还原性罗丹明类和 Rosamine 类染料 在活细胞内，无色的二氢罗丹明 (dihydrorhodamine) 类和二氢四甲基罗丹明 (dihydrotetramethylrosamine) 类染料被氧化为荧光产物使线粒体染色，然而，氧化作用可能是发生在其他细胞器而不是线粒体。二氢罗丹明 123 (D-632, D-23806) 在过氧化物酶存在的条件下与过氧化氢、铁或细胞色素 c 反应形成罗丹明 123。这种还原性罗丹明可用来监测大鼠肥大细胞的反应性氧，也可测定内皮细胞的过氧化氢。二氢罗丹明 6G (D-633) 是另一种还原性罗丹明，可被活细胞摄取和氧化。还原性 rosamine 的氯甲基衍生物 (MitoTracker Orange CM-H₂TMRos, M-7511;

MitoTracker Red CM-H₂XRos, M-7513), 可用于醛固定剂固定细胞的染色。Dihydrorhod-2 的乙酸甲基 (AM) 酯, 是由钙指示剂 rhod-2, AM (R-1244, R-1245) 通过化学还原作用制备的, 可用于测定线粒体内相对低浓度的 Ca²⁺ 变化。

6. 其他的线粒体选择性探针

(1) 碳花青类 最常用的染色活细胞线粒体的碳花青染料为短烷基链 (C1-C6) 的碳花青, 应用浓度为 (0.5 μmol/L 或 0.1 μg/ml)。在高浓度 (5~50 μmol/L 或 1~10 μg/ml) 条件下, 这些戊基或己基取代物也可染色内质网。DiOC₆ (3) (D-273) 可染活酵母菌的线粒体、其他的真核细胞、心肌细胞匀浆的肌浆网, 也可用来显示线粒体沿着微管的运动。线粒体或内质网结合的 DiOC₆ (3) 光解作用可特异地破坏细胞的微管而不影响肌动蛋白张力纤维, 因此对细胞内的细胞器运动性产生了高度抑制。还有一些电位敏感性碳花青探针也可染色活的培养细胞的线粒体。碳花青 DiOC₇ (3) (D-378), 其光谱与荧光黄相似, 是一种具有广泛用途的染料, 据报道是用于植物细胞线粒体染色的敏感探针, 它的其他用途包括: ①区分周期性和非周期性成纤维细胞, 区分有活性和无活性的细菌; ②追踪海鞘类卵受精过程中内质网的改建; ③确定鼠肿瘤功能性的血管构筑; ④研究多药抗性; ⑤显示 Alzheimer 病神经元轴突的详细形态学改变。

(2) 苯乙烯基染料 苯乙烯基染料 DASPMI (4-Di-1-ASP, D-288) 和 DASPEI (D-426) 可用于活细胞线粒体染色。这些染料具有较大的荧光 Stokes 位移, 染料的摄取相当缓慢, 是膜电位的函数。使用浓度暴涨法 (concentration jump method) 可对乙烯基吡啶盐 (styrylpyridinium) 染料的线粒体染色动力学进行了研究。DASPMI 和 DASPEI 的其他应用有: ①确定酵母突变型的线粒体分布; ②活的哺乳动物神经细胞及其连接的长时间成像; ③监测 *Pneumocystis carinii* 线粒体的代谢状态; ④筛选酵母菌异常的分布和形态。

D-288 即 4-Di-1-ASP, 分子式为 C₁₆H₁₉IN₂, 分子量为 366.24, CAS 编号/名称为 959-81-9; DASPEI, 分子式为 C₁₇H₂₁IN₂, 分子量为 380.27, CAS 编号/名称为 3785-01-1。

(3) 亲脂性的吖啶橙衍生物 壬基吖啶橙 (A-1372) 在活的 HeLa 细胞可保留长达 10 d, 因此是一种追踪在细胞分离过程中和细胞融合后线粒体的有用探针。这种异染性染料的线粒体摄取不依赖于线粒体膜电位。在高浓度是有毒的, 显然可与所有线粒体的心磷脂结合, 而与它们的能量状态无关。采用流式细胞术, 使用这种衍生物可对线粒体进行分析, 研究多药抗性、测量大鼠胸腺细胞凋亡过程中线粒体数量的改变。A-1372 即 acridine orange 10-nonyl bromide (nonyl acridine orange), 分子式为 C₂₈H₃₈BrN₃, 分子量为 472.51, CAS 编号 75168-11-5。

(4) 羧基 SNARF 用 SNARF 染料, 采用一种特殊的细胞负载技术可进行线粒体内 pH 的比率测定。细胞用 10 μmol/L 羧基 SNARF AM 醋酸酯 (C-1271、C-1272) 负载, 室温孵育 4h, 使羧基 SNARF-1 染料高度选择性的定位于线粒体, 从而检测它对线粒体 pH 的变化的反应。

(5) CoroNa Red Chloride 是一种最新的 Na⁺ 指示剂, CoroNa Red chloride (C-24430、C-24431) 自动地定位于线粒体, 对测定线粒体内的 Na⁺ 瞬变是有用的探针。

(6) Lucigenin 是一种非常著名的化学发光探针, lucigenin (L-6868) 可在肺泡巨噬细胞的线粒体内积聚。要获得满意的荧光染色, 常需要相当高的探针浓度 (约 100 μmol/L), 但是, 在低浓度时, 线粒体内刺激性的过氧化物产生时也可引起化学发光反应。其中分子探针公司的 Lucigenin 已经过高度纯化, 除去了亮绿色荧光污染物。

(7) 酵母菌线粒体染色样品试剂盒 荧光显微镜检查已广泛用于酵母菌研究, 为满足酵母菌线粒体探针的需要, 分子探针公司生产了一种酵母菌线粒体染色样品试剂盒 (Y-7530), 试剂盒中含有五种不同的选择性的标记酵母菌线粒体的探针, 即: ①罗丹明 123; ②罗丹明 B 己酯; ③SYTO 18 酵母菌线粒体染料; ④DiOC₆ (3)。

包括在试剂盒内的线粒体选择性核酸染料 (SYTO 18 酵母菌线粒体染料) 与核酸结合后出现显著的荧光增强, 即使在染料存在时, 其背景荧光也非常低。SYTO 18 是一种有效的活酵母菌线粒体染料, 但不能渗透进高等动物真核细胞的线粒体, 也不能对其线粒体进行染色。试剂盒中的每种成分也可单独使用, 包括 SYTO 18 酵母菌线粒体染料 (S-7529)。

7. 染色线粒体的卵白素交联物 哺乳动物细胞、细菌、酵母菌和植物内源性生物素化的蛋白质 (生物素羧酶) 只存在于线粒体, 此处为生物素合成的部位, 所以, 在没有应用任何生物素化的配体的情况下, 线粒体也可被任何检测标记的卵白素或链亲和素的衍生物选择性地染色。这样就可能影响实验结果的准确性。可用内源性生物素封闭试剂盒 (E-21390) 中的试剂进行封闭, 以防止内源性生物素的打响。常用的标记荧光素的卵白素及其衍生物见表 23-13。

8. 线粒体蛋白的抗体

(1) 特异识别氧化磷酸化系统蛋白的单克隆抗体 氧化磷酸化 (OxPhos) 发生在线粒体, 由 5 种大的膜结合蛋白复合物催化, 分别称为复合物 I (NADH-辅酶 Q 氧化还原酶)、复合物 II (辅酶 Q 琥珀酸盐氧化还原酶)、复合物 III (辅酶 Q 细胞色素 c 氧化还原酶)、复合物 IV (细胞色素 c 氧化酶) 和复合物 V (ATP 合成酶)。这些复合物是由多个亚基组成, 一些亚基由线粒体编码, 一些则由细胞核编码。如哺乳动物的细胞色素氧化酶 (COX) 由 13 个亚基组成, 3 个亚基 (亚基 I、II、III) 由线粒体 DNA 编码, 其余 10 个亚基则由细胞核 DNA 编码。这些复合物的装配还不十分清楚, 这些复合物中 1 个或多个复合物的装配缺陷可能是一些线粒体疾病的原因, 如 Alzheimer 和 Parkinson 病。

(2) 亚基特异的抗-OxPhos 复合物的单克隆抗体 为研究线粒体的功能和机能障碍, 已经生产出许多亚基特异的抗-OxPhos 复合物的单克隆抗体, 可特异识别氧化磷酸化系统的蛋白。氧化磷酸化系统成分的分子特征见表 23-14, 相应的抗体见表 23-15 和表 23-16。

这些抗体也被用来检测其他亚细胞制备物的线粒体污染, 这些单克隆抗体有一些严格的选择标准, 包括: ①固相结合试验如粒子浓度荧光免疫测定 (PCFIA) 和酶联免疫吸附试验 (ELISA) 中, 抗体检测天然蛋白质的能力; ②在全细胞提取物和分离的线粒体中进行 Western blot 实验时, 与适当变性亚基结合的特异性检测; ③在固定的培养人类细胞, 免疫组织化学反应产物特异性地定位于线粒体。

详细的抗体类型和建议工作浓度可参考每种产品的说明和操作步骤。对于这些单克隆抗体的检测或显示, 可使用分子探针公司的抗小鼠 IgG 二抗, 二抗可标记生物素、酶、1.4 nm 的纳米金簇 (NANOGOLD 1.4 nm gold clusters)、Captivate ferrofluid (俘获铁磁流体) 或一系列的荧光团。

(2) 特异识别 OxPhos 复合物 IV (细胞色素氧化酶) 的单克隆抗体 对于研究细胞色素氧化酶 (COX) 的结构和线粒体生物起源, 可采用抗 COX 的单克隆抗体, 可识别来自人类、牛和酵母菌的 COX。COX 催化电子从还原型细胞色素 c 向分子氧的传递, 伴随着质子跨线粒体内膜的转位。这种线粒体膜结合酶的组成亚基分别由线粒体 (I、II、III 亚基) 和细胞核 (其他的亚基) 编码。哺乳动物的 COX 共有 13 个亚基, 酵母菌 COX 有 11 个亚基。该单克隆抗体可用于研究许多生物体 COX 亚基的调节、装配和定位。而且, 识别牛 COX 的抗体也可识别相应的人 COX 亚基, 因此这些抗体对于分析人类的线粒体肌病和相关病症是有价值的手段。抗细胞色素氧化酶亚基 I 的 Alexa Fluor 488 和 Alexa Fluor 594 交联物 (A-21296、A-21297) 对线粒体进行直接染色效果也不错。

(3) 特异识别复合物 I、II、III、V 的单克隆抗体 也有一些抗 OxPhos 复合物的抗体, 它们主要是特异识别脊椎动物氧化磷酸化系统的另外的成分, 特异性识别复合物单一亚基的抗体, 识别的复合物包括复合物 I (NADH-辅酶 Q 氧化还原酶 39 000 道尔顿亚基, A-11140)、复合物 II (辅酶 Q 琥珀酸盐氧化还原酶 30 000 道尔顿和 70 000 道尔顿亚基, A-11141, A-11142)、复合物 III (辅酶 Q 细胞色素 c 氧化还原酶核心 I 亚基, A-11143) 和复合物 V 的 α 、 β 和 d 亚基 (A-21297, A-21298, A-21299)。当

表 23-13 常用的卵白素、链亲和素、NeutrAvidin 和 CaptAvidin 交联物

标记物 (最大吸收/发射波长) *	链亲和素	NeutrAvidin	卵白素	CaptAvidin
荧光交联物				
Alexa Fluor 350 (346/442)	S-11249	A-11236		
Marina Blue dye (365/460)	S-11221	A-11230		
Cascade Blue dye (400/420)		A-2663		
Cascade Yellow dye (402/554)	S-11228			
Pacific Blue dye (410/455)	S-11222	A-11231		
Alexa Fluor 430 (431/541)	S-11237			
Fluorescein (494/518)	S-869	A-2662	A-821	
Alexa Fluor 488 (495/519)	S-11223		A-21370	
Oregon Green 488 (496/524)	S-6368	A-6374		
BODIPY FL (505/513)	S-2642	A-2661	A-2641	
FluoSpheres (505/515)	F-8780	F-8771		
Oregon Green 514 (511/530)	S-6369			
Alexa Fluor 532 (530/554)	S-11224			
Alexa Fluor 546 (556/575)	S-11225			
Alexa Fluor 555 (555/565)	S-21381			
Tetramethylrhodamine (555/580)	S-870	A-6373		
R-Phycoerythrin (565/578)	S-866	A-2660		
Rhodamine B (570/590)	S-871			
Rhodamine Red-X dye (570/590)	S-6366	A-6378		
Alexa Fluor 568 (578/603)	S-11226			
Alexa Fluor 594 (590/617)	S-11227			
Texas Red dye (595/615)	S-872	A-2665	A-820	
Texas Red-X dye (595/615)	S-6370			
Alexa Fluor 633 (632/647)	S-21375			
Alexa Fluor 647 (650/668)	S-21374			
Alexa Fluor 647-R-PE (480/668)	S-20992			
Allophycocyanin (650/660)	S-868			
Alexa Fluor 660 (663/690)	S-21377			
Alexa Fluor 680 (679/702)	S-21378			
Alexa Fluor 680-R-PE (480/702)	S-20985			
Alexa Fluor 680-allophycocyanin (650/702)	S-21002			
其他交联物				
Agarose	S-951			C-21386
Alkaline phosphatase	S-921			
β -Galactosidase	S-931			
Horseradish peroxidase	S-911	A-2664		
NANOGOLD	N-24918			
CMNB-caged fluorescein	S-21380			
Acrylamide	S-21379			C-21387
未标记卵白素	S-888	A-2666	A-887, A-2667	C-21385

* 交联物近似的最大吸收和荧光发射波长 (nm)。

这些单克隆抗体和细胞色素氧化酶的抗体结合使用时,即可对正常和病变组织中氧化磷酸化酶复合物的相对水平进行评价。

抗牛 OxPhos 复合物 V 亚基的抗体、抗 F_1F_0 -ATPase 亚基的小鼠单克隆抗体 7H10 (A-11144)、抗 F_1F_0 -ATPase 亚基的小鼠单克隆抗体 7E3 (A-21299) 已经用于模拟血管抑素 (angiostatin) 蛋白,血管抑素是一种血管生成的有力抑制剂。血管抑素蛋白靶定到 F_1F_0 -ATP 合成酶,可抑制内皮细胞表面 ATP 的代谢,因此可阻断细胞的迁移和增生,这对于血管生成是必需的。研究显示抗 ATPase 抗体有相似的抑制效果,也就是说它们同样可阻断 ATP 的代谢,有血管抑素类似物的功能。

(4) 特异识别酵母菌线粒体膜的单克隆抗体 为检测酵母菌线粒体膜,可使用抗酵母菌线粒体穿孔素 (porin) 单克隆抗体 16G9 (A-6449)。穿孔素是一种分子量约 30 000 道尔顿的固有膜蛋白,定位于酵

表 23-14 氧化磷酸化系统成分的分子特征

复合物	名称	预期分子量*	SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分子量	替代名称	蛋白	基因§
I	NADH-辅酶 Q 氧化还原酶	42.5	39.0	α 复合物, 9 (39kD)	Q16795 ⁺	NDUFS2L NDUFA9
III	辅酶 Q 细胞色素 c 氧化还原酶, 核心 2 亚基	42.7	45.0	细胞色素 b	P22695 ⁺	VQCRC2
II	辅酶 Q 琥珀酸 30 kDa 亚基	31.6	30.0	27K 铁硫蛋白	A34045 ⁺	SDH1
	盐氧化还原酶 72 kDa 亚基	72.7	70.0	黄素蛋白	JX0336 ⁺⁺	SDH2
IV	细胞色素 c 氧亚基 I	57.0	39.5	COX I 链	ODHU1 ⁺	MTCO1
	化酶 (COX) 亚基 II	25.6	34.0	COX II 链	OBHU2	MTCO2
	亚基 IV	19.6	17.0	COX III 链	OLHU4 ⁺⁺	COX4
	亚基 IV	19.6	17.0	COX IV 链	OLHU4 ⁺⁺	COX4
	亚基 Vb	13.7	8.0	COX IVb 链	OTHU5B ⁺⁺	COX5B
	亚基 VIc	8.7	6.0	COX VIc 链	OGHU6C ⁺⁺	COX6C
V	ATP 合成酶 α 亚基	59.8	53.0	F ₁ 复合物, α 亚基	PWHUA ⁺⁺	ATP5A1
	β 链	56.6	53.0	F ₁ 复合物, β 亚基	A33370 ⁺⁺	ATP5B
	d 亚基		29.0	F ₀ 复合物, d 亚基		

* 分子量 (单位 kDa); + SWISS-PROT 的 (蛋白质序列数据库, 网址: <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>) 蛋白质索引号。
 ++ 蛋白质信息资源 (Protein Information Resource, PIR) 的蛋白质索引号, PIR 是一公共领域全面广泛交叉引用的蛋白质序列数据库 (网址: <http://www-nbrf.georgetown.edu/>); § Genbank 的基因索引号, 可经以下网址访问: (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>)。

表 23-15 特异性识别氧化磷酸化系统蛋白的单克隆抗体

产品编号	氧化复合物	亚基特异性	单克隆抗体*	同位型	Western blot 建议浓度	免疫组织化学 建议浓度	种 属 特 异 性
							人 牛 大鼠 小鼠
A-11140	I	39 kDa 亚基	20C11	IgG ₁ , k	2 μg/ml	NR	+ + ▲ + ND
A-11141	II	30 kDa 亚基	21A11 文献 1	IgG _{2a} , k	5 μg/ml	5 μg/ml	+ + ▲ + ND
A-11142	II	70 kDa 亚基	2E3-GC12 文献 1	IgG ₁ , k	0.1 μg/ml	0.5 μg/ml	+ + ▲ + ND
A-11143	III	核心 2 亚基	13G12	IgG ₁ , k	0.4 μg/ml	1 μg/ml	+ + ▲ + ND
A-6403	IV (COX)	亚基 I	1D6 文献 1~3	IgG _{2a} , k	2 μg/ml	5 μg/ml §	+ ▲ + + +
A-6404	IV (COX)	亚基 II	12C4 文献 1~3	IgG _{2a} , k	2 μg/ml	5 μg/ml	+ ▲ ± ± ±
A-6431	IV (COX)	亚基 IV	20E8 文献 3~4	IgG _{2a} , k	0.2 μg/ml	5 μg/ml	+ + ▲ + +
A-6409	IV (COX)	亚基 IV	10G8 文献 1~4	IgG _{2a} , k	0.5 μg/ml	5 μg/ml	+ + ▲ - -
A-6456	IV (COX)	亚基 Vb	16H12 文献 2, 3	IgG _{2a} , k	3 μg/ml	NR	+ + ▲ + +
A-6401	IV (COX)	亚基 VIc	3G5 文献 1~3	IgG _{2a} , k	2 μg/ml	5 μg/ml §	+ + ▲ + ND
A-11144	V (ATPase)	α 亚基	7H10	IgG _{2a} , k	4 μg/ml	5 μg/ml §	+ + ▲ + ND
A-21298	V (ATPase)	d 亚基	7F9	IgG _{2a} , k	4 μg/ml	5 μg/ml	+ + ▲ - ND
A-21299	V (ATPase)	β 亚基	7E3	IgG _{2a} , k	4 μg/ml	ND	+ + + ND

* 小鼠单克隆抗体识别号和参考文献; ▲ 指用于抗体制备的抗原种类, 用于制备 ATPase 的抗原来自大肠杆菌亚基; (+) 强反应性; (±) 弱反应性; (-) 无反应性; 当这些单克隆抗体用于免疫组织化学实验时, 用多聚甲醛固定的目标细胞在用丙酮穿透和封闭前, 可能需要进行抗原修复。§ 这些单克隆抗体采用间接免疫组织化学方法可获得最强和最稳定的信号。ND, 未确定; NR, 不推荐。参考文献: 1. Biochim Biophys Acta 1997; 1362: 145~159; 2. Biochim Biophys Acta 1996; 1315: 199~207; 3. Methods Enzymol 1995; 260: 117~132; 4. Biochim Biophys Acta 1993; 1225: 95~100

母线粒体外膜, 其他识别内部线粒体膜蛋白的酵母菌 COX 抗体已在前面叙述。目前可得到的线粒体探针总结如下, 见表 23-17 和表 23-18。

表 23-16 用于酵母菌细胞生物学的单克隆抗体

产品编号	抗体识别的酵母菌抗原	抗原定位的酵母菌细胞结构	单克隆抗体	小鼠同位型	Western 分析	免疫荧光
A-6449	线粒体穿孔素	线粒体外膜	16G9	IgG ₁ , k	是	是 *
A-6422	V-ATPase 69 000-道尔顿亚基	液泡膜	8B1	IgG _{2a} , k	是	是
A-6426	V-ATPase 100 000 道尔顿亚基	液泡膜	10D7	IgG _{2a} , k	是	是
A-6427	V-ATPase 60 000 道尔顿亚基	液泡膜	13D11	IgG ₁ , k	是	是 *
A-6458	碱性磷酸酶 (ALP)	液泡膜	1D3	IgG ₁ , k	是	是 *
A-6428	羧肽酶 Y (CPY)	液泡腔	10A5	IgG ₁ , k	是	是
A-6429	Dol-P-Man 合成酶 (Dpmlp)	内质网膜	5C5	IgG ₁ , k	是	是 *
A-21273	酵母 Pep12p	内体膜	2C3	IgG ₁ , k	是	是
A-21274	酵母 Vsp10p	晚期高尔基氏体膜	18C8	IgG _{2a} , k	是	否
A-6457	3-磷酸甘油激酶 (PGK)	细胞溶胶	22C5	IgG ₁ , k	是	是

* 使用间接免疫荧光法时, 这些单克隆抗体可产生最强和最稳定的信号; 抗 ALP 抗体是检测酵母菌液泡膜最可靠的单克隆抗体。

表 23-17 线粒体探针

荧光探针产品编号	商品名称
化学发光探针	
L-6868	Lucigenin
绿色荧光探针	
A-1372	Nonyl acridine orange
D-273	DiOC6 (3)
D-378	DiOC7 (3) (for plant mitochondria)
M-7502	MitoFluor Green
M-7514	MitoTracker Green FM *
R-302, R-22420	Rhodamine 123
S-7529	SYTO 18 yeast mitochondrial stain
T-3168	JC-1
D-22421	JC-9
黄色和橙黄色荧光探针	
D-288	4-Di-1-ASP (DASPMI)
D-426	DASPEI
M-7510	MitoTracker Orange CMTMRos *
R-634	Rhodamine 6G
R-648	Rhodamine B, hexyl ester
T-7539	Tetrabromorhodamine 123
T-639	Tetramethylrhodamine
T-668	Tetramethylrhodamine, methyl ester
T-669	Tetramethylrhodamine, ethyl ester
红色荧光探针	
M-7512	MitoTracker Red CMXRos *
T-3168	JC-1
D-22421	JC-9
M-22424	MitoFluor Red 589
M-22422	MitoFluor Red 594
红外线荧光探针	
M-22423	MitoFluor Far Red 680

* 可用乙醇固定的探针。

表 23-18 需要细胞内氧化的线粒体探针

荧光探针产品编号	商品名称
绿色荧光探针	
D-632	Dihydrorhodamine 123
黄色和橘黄色荧光探针	
D-633	Dihydrorhodamine 6G
M-7511	MitoTracker Orange CM-H ₂ TMRos *
T-7539	Tetrabromorhodamine 123
红色荧光探针	
M-7513	MitoTracker Red CM-H ₂ XRos *
R-14060	RedoxSensor Red CC-1#

* 醛可固定探针；* 根据细胞液内氧化还原电位的不同，氧化产物在线粒体和溶酶体之间的分布不同。

二、溶酶体、酵母菌液泡和其他酸性细胞器的探针

(一) 溶酶体的形态结构、分类和功能

溶酶体 (lysosome) 为细胞浆内由单层脂蛋白膜包绕的内含一系列酸性水解酶的小体，形态学上往往只有联合运用电镜和细胞化学方法才能肯定地加以确认。溶酶体可分为初级溶酶体和次级溶酶体。溶酶体是极为重要的细胞器，能参与细胞的一系列生物功能和无数的物质代谢过程，因此，其功能障碍将导致细胞的病理改变，从而在许多疾病的发病机制中具有重要意义。

(二) 溶酶体、酵母菌液泡和其他酸性细胞器的探针

一些用于染色溶酶体和酵母液泡的试剂，也可用来染色其他的酸性成分，包括移行高尔基泡 (*trans*-Golgi vesicles)、内体、成纤维细胞被覆小泡、分泌胰岛素的胰腺细胞的分泌泡、精子顶体和植物液泡。溶酶体中含有糖苷酶、酸性磷酸酶、弹性蛋白酶、组织蛋白酶、羧肽酶和许多其他蛋白酶。一些人类疾病与影响细胞内溶酶体、高尔基氏体和内质网的转运过程有关，可参考相关的综述文献。将常用的探针简介如下：

1. **LysoTracker 探针：酸性细胞器选择性的细胞通透性探针** 弱碱性的胺类可选择性积聚于内部 pH 值低的细胞内结构，可用来研究溶酶体的生物合成和致病作用。一种经常使用的酸性细胞器探针是 DAMP (D-1552)，它是一种无荧光的试剂，应与抗 DNP 抗体联合应用，抗体上可直接或间接交联荧光团或酶，虽然缺乏特异性，但荧光探针中性红 (N-3246) 和吖啶橙 (A-1301、A-3568) 也常用来染色酸性细胞器。

这些缺陷使人们致力于搜寻替代性的酸性细胞器选择性探针，用来进行短期或长期的示踪研究。LysoTracker 探针是荧光嗜酸性的探针，可进行标记和示踪活细胞的酸性细胞器。这些探针有几种重要的特性，包括对酸性细胞器的高度选择性，在纳摩尔浓度即可有效标记活细胞。此外，LysoTracker 探针还有多种颜色荧光 (表 23-19)，因此适合多色荧光标记研究。

LysoTracker 探针通常由一个荧光团与一个弱碱基相连，在中性 pH 仅部分质子化，可自由穿透细胞膜特定地集中在球形细胞器。荧光 LysoTracker 探针应在极低浓度使用，常用浓度为 50 nmol/L，这样可获得最理想的选择性。保留的机制还未确定，可能与质子化以及细胞器膜的截留有关，细胞经弱碱性的细胞穿透性化合物处理后，其染色也可保留，而且，用 LysoTracker Red DND-99 (L-7528) 染色时，细胞内较大的酸性成分染色图像即使在使用醛固定剂固定后也保持不变。LysoTracker Green DND-26 (L-7526) 在膜蛋白的研究中被用来识别促进锌的囊螯合作用，在去神经支配的骨骼肌用罗丹明 B 标记可显

表 23-19 LysoTracker 探针

产品编号 #	探针	吸收波长 * (nm)	发射波长 * (nm)	pKa
L-7525	LysoTracker Blue DND-22	373	422	未确定
L-12490	LysoTracker Blue-White DPX	380	#	未确定
L-12491	LysoTracker Yellow HCK-123	465	535	未确定
L-7526	LysoTracker Green DND-26	504	511	未确定
L-7528	LysoTracker Red DND-99	577	590	未确定

* 最大吸收和发射波长是指水性缓冲液或甲醇中的测定值，在细胞环境中可能会发生某些变化。# 发射波长对环境相当敏感，虽然最大发射波长为 576 nm，但溶酶体染色为蓝白色

示酸性细胞器，可用来评估冷冻保护的牛精子顶体的完整性；LysoTracker 探针也可用于连续性监测肺泡 II 型细胞通过板层小体的出胞作用分泌表面活性物质的过程；LysoTracker Red DND-99 可用来检查锥虫 (*Trypanosoma brucei*) 特异性地摄取肿瘤坏死因子后溶酶体的损伤，研究小鼠胚胎器官发生期的凋亡现象，确定受体和通道蛋白的亚细胞定位。

LysoTracker Green DND-26 (L-7526) 的动力学研究表明染料被活细胞在数秒内摄取内化，不幸的是，这些溶酶体探针在溶酶体内可能呈现出“碱化效应 (alkalinizing effect)”，即用这些探针长时间孵育可造成溶酶体 pH 的增高，因此，建议在进行图像采集前 1~5 min 才用这些探针孵育细胞。LysoTracker 探针主要用荧光显微镜检查，因为细胞存在自发荧光或非特异性染色，因此用 LysoTracker 染料染色细胞时，溶酶体的荧光仅占整个细胞荧光的一部分。在流式细胞术或荧光测定术中，用作定量溶酶体数量时，可能与应用的特定细胞系和使用的染色步骤有关。

2. LysoSensor 探针：酸性细胞器选择性 pH 指示剂 研究活细胞溶酶体生物发生和功能，可采用 LysoSensor 探针——一种可定位到酸性细胞器的荧光 pH 指示剂。LysoSensor 染料是嗜酸性探针，通过质子化作用在酸性细胞器积聚，通过它的弱碱基侧链的这种质子化作用也减轻了染料的荧光淬灭，引起荧光强度增加，因此，LysoSensor 试剂在酸化作用下，其荧光强度显示出 pH 依赖性的增加。而 LysoTracker 探针，在酸性 pH 其荧光强度基本上不增强，因为这些探针定位于细胞器膜，因此表 23-18 中所列出的 pKa 值与在细胞环境中测定的不相同，仅能进行细胞器 pH 定性和半定量的比较，蓝色和绿色荧光 LysoSensor 探针最适合的 pH 敏感范围是酸性或中性区域 (pKa 约 5.2 或约 7.5)。由于 pKa 值低，LysoSensor Blue DND-16 (L-7533) 和 LysoSensor Green DND-189 (L-7535) 几乎无荧光，只有它们在酸性细胞器内才有荧光，而 LysoSensor Green DND-153 (L-7534) 在中性 pH 有明亮的荧光。LysoSensor Yellow/Blue DND-160 (L-7545) 是唯一的 pH 依赖性双激发和发射波长溶酶体探针，LysoSensor Yellow/Blue DND-160 在酸性细胞器主要为黄色荧光，在弱酸性细胞器则为蓝色荧光。双发射测量可用来进行酸性细胞器如溶酶体 pH、髓白血病细胞和植物细胞酸性液泡的比率成像测定。5 种不同颜色和 pKa 的 LysoSensor 探针列表如下，见表 23-20。

LysoSensor Yellow/Blue 染料与葡聚糖 (分子量 10 000 Da) 的交联物 (L-22460) 也可用来进行溶酶体标记，当标记的葡聚糖被细胞摄取后，通过入胞途径迁移，LysoSensor 探针的荧光在近中性的内体为蓝色，而在酸性溶酶体为长波长的黄色荧光，从而可清楚追踪其迁移过程。荧光发射的最大改变发生在 pH 值约为 3.9 时，此值接近染料 pKa。与细胞通透性的 LysoSensor 不同，LysoSensor Yellow/Blue 葡聚糖可采用荧光显微镜检查或流式细胞术测定溶酶体的 pH 值，在不同 pH 的缓冲液中，L-7545 和 L-22460 激发和发射波长不同。

本节讨论的细胞通透性的探针可单独 (或联合) 用来研究细胞内溶酶体的酸化和溶酶体功能或运输的改变。LysoSensor 探针在研究一些病变中有重要作用，如某些肿瘤细胞其溶酶体的 pH 比正常细胞低，而另外一些肿瘤细胞则含有高 pH 的溶酶体。另外，囊性纤维化和其他疾病可造成某些细胞内细胞器酸化的缺陷。LysoSensor Green DND-189 可用来选择性的标记颗粒细胞轴突内的酸性区隔，与 LysoSensor

表 23-20 LysoSensor 探针

产品编号 #	探针	吸收波长 * (nm)	发射波长 * (nm)	pK _a
L-7533	LysoSensor Blue DND-167	373	425	5.1
L-7535	LysoSensor Green DND-189	443	505	5.2
L-7534	LysoSensor Green DND-153	442	505	7.5
L-7545	LysoSensor Yellow/Blue DND-160	384, 329	540 [*] , 440 [§]	3.9
L-22460	LysoSensor Yellow/Blue 10 000 MW dextran	381, 325	521 [*] , 452 [§]	4.2

* 最大吸收和发射波长是指水性缓冲液或甲醇中的测定值, 在细胞环境中可能会发生某些变化。^{*}pH=3, [§]pH=7; 这种染料具有 pH 依赖性的双激发和发射峰值

Green DND-153 联合应用可检测突变 CHO 细胞系中内体和溶酶体的酸化。在一种人 U-937 髓白血病细胞阿霉素选择的变异体获得性药物抗性表型, 用 LysoSensor Yellow/Blue DND-160 进行的研究证明有溶酶体的参与。LysoSensor Yellow/Blue DND-160 内化的动力学研究表明探针被活细胞在数秒内摄取。但要特别注意的是, 该探针在溶酶体内呈现出“碱化效应”, 即用这些探针长时间孵育可造成溶酶体 pH 的增高, 因此, 孵育时间应短, 建议在进行图像采集前 1~5min 才用这些探针孵育细胞。与 LysoTracker 一样, 探针主要用荧光显微镜检查。因为细胞存在自发荧光或非特异性染色, 因此用 LysoSensor 染料染色细胞时, 溶酶体的荧光仅占整个细胞荧光的一部分。在流式细胞术或荧光测定术中, 用作定量溶酶体数量时, 可能与应用的特定细胞系和使用的染色步骤有关。

(三) DAMP 和其他的嗜溶酶体探针 (Lysosomotropic Probe)

1. **DAMP** DAMP 试剂 D-1552 是一种弱碱性的胺, 可被活细胞的酸性细胞器摄取。这种细胞通透性的嗜酸性试剂可用抗 DNP 抗体检测, 这些抗体可用荧光染料、铁蛋白、胶体金 (包括用于光镜和电镜的 NANOGOLD 试剂) 或酶标记。DAMP 可广泛用于光镜、电镜检测酸性细胞器, 其他用途包括: ①海胆胚胎卵黄盘 (胚盘) 的酸化研究; ②囊性纤维化患者细胞内细胞器酸化缺陷的检测; ③胰岛 β 细胞胰岛素原向胰岛素转化的 pH 依赖性; ④自噬泡的形成; ⑤病毒感染过程中, 细胞内酸性细胞器的定位。

与 DAMP 比较, 前面叙述的细胞通透性的 LysoTracker 和 LysoSensor 探针在这些领域的应用更方便。因为不需要进行二次显示试剂进行标记, 可以直接观察活细胞酸性细胞器的动态过程。

2. **RedoxSensor Red CC-1 染料** RedoxSensor Red CC-1 染料 (R-14060) 的荧光定位与胞质液的氧化还原电位有关, 一旦 RedoxSensor Red CC-1 染料被动进入活细胞, 就可在胞质液被氧化为红色荧光产物 (最大激发/发射波长约 540/600 nm), 而后可在线粒体积累。这种无荧光探针也可被转运至溶酶体, 并在溶酶体氧化, 氧化产物在线粒体和溶酶体的不同分布决定于胞质液的氧化还原电位。在增殖细胞, 线粒体染色为主, 而接触抑制的细胞, 染色主要在溶酶体。因此, RedoxSensor Red CC-1 染料在某些实验系统可作为有用的溶酶体探针。定量测定氧化产物分布的最好方法是将 RedoxSensor Red CC-1 染料和 MitoTracker Green FM 染料 (M-7514) 联合应用。

3. **其他的嗜溶酶体探针** BODIPY FL 组胺 (B-22461) 是由 pH 不敏感的、明亮绿色荧光 BODIPY FL 染料和弱碱性咪唑基组胺结合构成, 低浓度时, 可选择性染色溶酶体。与 LysoTracker 和 LysoSensor 探针相同, Dapoxyl (2-aminoethyl) sulfonamide (D-10460) 中胺基的弱碱性导致它在酸性细胞器的积累。Dapoxyl (2-aminoethyl) sulfonamide 被小鼠精子完整顶体的酸性腔摄取, 伴随着探针荧光强度的显著增强。在顶体反应开始后, Dapoxyl (2-aminoethyl) sulfonamide 的荧光强度随 pH 梯度的降低显著下降。高纯度的中性红 (N-3246) 是一种常用的溶酶体探针, 可将溶酶体染成红色。还可利用微孔板方法确定粘附和非粘附细胞的数量, 用来染色脑组织的细胞。另外, 丹磺酰尸胺 (D-113) 和吖啶橙 (A-1301, A-3568) 据报道也是有用的嗜溶酶体探针, 丹磺酰尸胺可选择性地标记自噬泡, 至少一部分自噬泡已经与溶酶体融合, 可是在早期或晚期内体无丹磺酰尸胺积聚。

(四) 受体介导的入胞作用的配体

除这些嗜溶酶体探针外,还有多种低密度脂蛋白(LDL)和荧光转铁蛋白交联物。一旦内化后,LDL从它的受体解离,并最终积聚在溶酶体中。由于荧光 DiI LDL(L-3482)和荧光黄转铁蛋白(T-2871)的荧光颜色对比明显,因此可同时应用分别追踪溶酶体的直接途径和再循环途径。荧光黄转铁蛋白的 pH 敏感性已被用来研究内体酸化过程中发生的事件。同样地,荧光 pH 指示剂标记的葡聚糖,也可用来监测通过入胞作用,酸性细胞器内外源性物质的摄取和内化的过程。将常用的溶酶体探针总结如下,见表 23-21 和表 23-22。

表 23-21 酸性细胞器(包括溶酶体)探针

蓝色荧光和无荧光探针	
D-1552	DAMP *
H-22845	Hydroxystilbamidine ⁺
L-7525	LysoTracker Blue DND-22 ⁺
L-12490	LysoTracker Blue-White DPX
绿色荧光探针	
L-7526	LysoTracker Green DND-26
黄色和橙色荧光探针	
D-113	Dansyl cadaverine
L-12491	LysoTracker Yellow HCK-123
红色荧光探针	
L-7528	LysoTracker Red DND-99
R-14060	RedoxSensor Red CC-1 [#]

* 无荧光的探针。+蓝色荧光探针。# 根据胞质液氧化还原电位的不同,氧化产物在线粒体和溶酶体的分布有差别

表 23-22 酸性细胞器探针,包括 pH 敏感的溶酶体探针

蓝色荧光探针	
L-7533	LysoSensor Blue DND-167
L-7545	LysoSensor Yellow/Blue DND-160 *
L-22460	LysoSensor Yellow/Blue10,000 MW dextran*
绿色荧光探针	
L-7534	LysoSensor Green DND-153
L-7535	LysoSensor Green DND-189
黄色和橙色荧光探针	
A-1301	Acridine orange
L-7545	LysoSensor Yellow/Blue DND-160 *
L-22460	LysoSensor Yellow/Blue 10,000 MW dextran *
红色荧光探针	
N-3246	中性红

* 双发射波长探针

三、内质网和高尔基复合体探针

(一) 内质网的结构

除红细胞外,内质网或多或少地见于其他各种细胞。内质网为由生物膜构成的互相通连的片层隙状或小管状系统,膜片间的隙状空间称为池,通常与细胞外隙和细胞浆基质之间不直接相通。这种细胞内的膜性管道系统一方面构成细胞内物质运输的通路,另一方面为细胞内各种各样的酶反应提供广阔的反应面积。根据是否有核糖体附着、内质网与高尔基复合体及核膜相连续,内质网可分为粗面内质网和滑面内质网。

(二) 高尔基复合体的结构、功能

高尔基复合体见于一切有核细胞,来自核膜外层,由数列弯曲成蹄铁状的扁平囊组成,在横切面上表现为光面双膜,其末端膨大成烧瓶状。高尔基复合体面向核的一面称为形成面,由许多与粗面内质网池相连的小泡构成;另一面称为成熟面,由此断下一些较大的泡,内含分泌物。由粗面内质网合成的蛋白质输送到此,经加工装配形成分泌颗粒,分泌到细胞外,例如肝细胞合成的白蛋白和脂蛋白即按此方式形成和输出。此外,细胞本身的酶蛋白如溶酶体的水解酶类也是这样,但却不装配成分泌颗粒和排出细胞外,而是以高尔基小泡的形式(初级溶酶体、前溶酶体)输送到各种吞噬体中。高尔基复合体在形成含糖蛋白的分泌物中、在构成细胞膜及糖萼中以及在形成结缔组织基质中也均起着重要的作用。在一定类型细胞中高尔基复合体的形态和位置较恒定,在神经元中,高尔基复合体位于核周围;肝细胞中位于细胞核与毛细胆管面之间的胞质区域内。凡具有分泌功能的细胞,高尔基体均发达,如胰腺细胞、唾液细胞和小肠上皮细胞。

(三) 内质网和高尔基复合体探针

内质网和高尔基复合体是主要负责脂类和蛋白质适当分拣的细胞器,所以,这些细胞通透性的细胞器探针中大部分是脂类或影响蛋白质运动的化学物质。高尔基复合体最有效的探针是神经酰胺和鞘脂,脂类通过这些细胞器进行运输的问题与信号转导有关。通过溶酶体、高尔基复合体和内质网影响细胞内运输过程的综述可参考相应的文献。内质网的酶参与胆固醇和膜的合成,通过细胞色素 P_{450} 系统进行疏水性药物的解毒作用。高尔基复合体中对脂类和蛋白质进行糖基化作用的酶可合成一些荧光植物凝血素,并可作为这些细胞器的有用标志(彩图 12)。

在活细胞和固定的死细胞,内质网和高尔基复合体的扁平膜囊结构能被许多亲脂性的荧光探针染色,并可根据它们的形态进行区分。高尔基复合体可被一种荧光神经酰胺类似物选择性地染色,这些探针的亲脂性使它们容易负载入活细胞,常使用 DMSO 溶解后进行负载。尼氏体主要由排列规则的板层状粗面内质网和大量多聚核糖体组成,尼氏体可用相应的荧光试剂进行染色。

1. 蓝-白色 DPX 内质网示踪剂 蓝-白色 DPX 内质网示踪剂 (ER-Tracker Blue-White DPX, E-12353) 是一种对活细胞内质网有高度选择性和光稳定性的荧光探针(彩图 13)。与传统的内质网探针 $DiOC_6(3)$ 不同,该试剂不能染色线粒体,低浓度对细胞无毒性。用醛类固定剂固定后,染色特征可得到保持,但荧光强度略有减弱。E-12353 属于 Dapoxyl 染料家族,其 Stokes 位移大,在疏水环境中,具有较高的消光系数和高的光量子产率。其荧光强度对环境高度敏感,荧光强度随着溶剂极性的增加而增强,最大荧光强度位移至较长的波长,同时光量子产率降低,荧光发射的峰值在 430~640 nm 之间。E-12353 用双光子显微镜很容易观察,一般建议使用标准的 DAPI 或 UV 长波通滤光片观察内质网染色,可参见滤光片选择部分。

2. 碳花青染料

(1) 短链碳花青染料 Terasaki 及其同事利用短链碳花青 $DiOC_6(3)$ (D-273) 观察了活细胞和醛固定剂固定细胞内的内质网。这种染料与 D-272 相似,已经广泛用于研究神经细胞、酵母、洋葱表皮内质网结构性的相互作用和动力学,也被用来检查不同类型细胞的内质网、线粒体、中间丝的形态学关系。D-272、D-273 可透过细胞膜使细胞内膜性结构染成荧光黄样的颜色,根据内质网独特的形态特点,很容易识别内质网。罗丹明 6G 和罗丹明 B 己酯 (R-634、R-648) 染色与 $DiOC_6(3)$ 相似,但毒性更小,

颜色为橙色,因此可用来进行多色标记。当在极低浓度应用时,这些轻度亲脂性的染料则仅使活细胞线粒体着色。

(2) 长链碳花青染料 Terasaki and Jaffe 使用长链碳花青染料 $\text{DiOC}_6(3)$ 和 $\text{DiOC}_6(3)$ 标记内质网膜,通过将溶解于油中的饱和 DiI 显微注射入海胆 (sea urchin) 卵中达到了选择性标记内质网的目的。与二烷基碳花青 (dialkylcarbocyanine) 和二烷基氨基苯乙烯基 (dialkylaminostyryl) 探针一样,DiI 只能在连续性的膜中扩散,这种方法已经成功标记了其他几种卵,但不能标记软体动物的卵或节肢动物的轴突。

3. 布雷菲德菌素 (Brefeldin) A 及其荧光类似物 已经证明真菌代谢物布雷菲德菌素 (brefeldin A, BFA) 对于仔细分析细胞代谢过程,如小泡的形成和 kinesin 分布以及新合成蛋白质的输出有重要意义。该类荧光探针包括从青霉菌 (*Penicillium brefeldianum*) 分离的自然产物 (B-7450),以及绿色和橙色荧光的布雷菲德菌素 A BODIPY 衍生物 (B-7447、B-7449)。BFA (B-7450) 在细胞内有多个靶位,将细胞暴露于 BFA,可引起细胞内蛋白质从内质网到高尔基复合体转运的紊乱,最后引起高尔基复合体形态的消失,将 BFA 完全去除后,可使这种作用逆转。BFA 也可改变内体和溶酶体的形态。BFA 被用来防止视黄酸的免疫毒素作用、研究蛋白质在极性上皮细胞的迁移、研究与高尔基复合体结合的 ADP-核糖基化作用 (ribosylation) 因子的调节。使用荧光内体标志物如 lucifer yellow CH (L-453) 和四甲基罗丹明标记的转铁蛋白 (T-2872) 可监测 BFA 的行为。研究人员用 BFA 检测了细胞因子在细胞内的表达。BFA 可破坏高尔基复合体介导的细胞内转运,引起细胞因子积聚,使细胞因子信号增强,可采用流式细胞仪进行检测。荧光 Brefeldin A 绿色荧光 BODIPY FL 和橘红色荧光 BODIPY 558/568 BFA 衍生物 (B-7447、B-7449) 在四种不同的细胞系可选择性定位于内质网和高尔基复合体。BODIPY 558/568 BFA 可与 NBD C_6 -神经酰胺 (N-1154) 联合应用,同时研究内质网和高尔基复合体的变化;BODIPY 558/568 还可与内质网探针 ER Tracker Blue-White DPX 联合应用标记 *hyphae* 的内质网。但是,荧光 BFA 衍生物的生物活性是有限的,细胞内酯酶可将 BODIPY 荧光团从 BFA 裂解。荧光神经酰胺类似物 NBD C_6 -神经酰胺 (N-1154) 和 BODIPY FL C_5 -神经酰胺 (D-3521),都可采用荧光黄的滤片组检测,可选择性染色高尔基复合体,光谱特点与 Texas Red 染料相似的 BODIPY TR 神经酰胺 (D-7540) 对于荧光双标记实验特别有用,可与绿色荧光蛋白联合应用。对于采用 CCD 相机或其他红色敏感的探测器进行图像采集的显微镜,使用 BODIPY TR 荧光团是理想的选择。

4. NBD C_6 -神经酰胺和 NBD C_6 -鞘磷脂 NBD C_6 -神经酰胺 (N-1154) 广泛用于活细胞和固定细胞的移行高尔基体 (*trans*-Golgi) 选择性染色。将牛血清白蛋白 (BSA) 与荧光神经酰胺配合,不需有机溶剂溶解探针即可容易地进行细胞标记,如 NBD C_6 -神经酰胺与脱脂 BSA 结合物 (N-22651)。其主要用途包括:①囊性纤维化移行高尔基体 (*trans*-Golgi) 酸化作用缺陷的检测;②从高尔基复合体到内质网蛋白质转运过程中 BFA (B-7450) 的作用;③Farber 病研究;④研究通过分泌途径糖蛋白转运的抑制;⑤凝血酶受体的细胞内转运 (trafficking) 和靶定;⑥在分离分泌突变体过程中,通过荧光激活细胞分检 (fluorescence-activated cell sorting) 研究分泌活性;⑦Vero 细胞中 verotoxin B 亚基的亚细胞分布。

此外,NBD C_6 -神经酰胺的荧光强度显然对高尔基复合体的胆固醇含量敏感,而用 BODIPY FL C_5 -神经酰胺则没有这种现象,如含有 NBD C_6 -神经酰胺的细胞缺乏胆固醇,则积聚在高尔基复合体的 NBD C_6 -神经酰胺有严重光不稳定性,这种光漂白作用可通过刺激胆固醇的合成而降低,因此,NBD C_6 -神经酰胺可用来监测活细胞高尔基复合体的胆固醇含量。在体研究发现 NBD C_6 -神经酰胺可转化为 NBD C_6 -

糖基神经酰胺和 NBD C₆-鞘磷脂 (N-3524), 该探针在活的中国仓鼠卵巢 (CHO) 成纤维细胞的代谢已经被用来描述脂类转运的途径。在疟原虫感染的红细胞, NBD C₆-神经酰胺可代谢为 NBD C₆-鞘磷脂, 但在正常红细胞则不能代谢为 NBD C₆-鞘磷脂。与 NBD C₆-神经酰胺相似, NBD C₆-鞘磷脂被用来研究细胞器间脂类的转运。正常成纤维细胞可水解 NBD C₆-鞘磷脂, 并通过高尔基复合体进行处理, 但 Niemann-Pick 病患者的皮肤成纤维细胞溶酶体缺乏神经磷脂酶活性, 造成大量 NBD C₆-鞘磷脂在溶酶体积聚。

5. BODIPY 神经酰胺和 BODIPY 鞘磷脂 绿色荧光的 BODIPY FL C₅-神经酰胺 (D-3521) 有较强的抗光漂白作用, 其荧光强度比 NBD 衍生物明亮, 在许多应用中可取代 NBD C₆-神经酰胺。与 NBD C₆-神经酰胺相似, 也可采用 BODIPY FL C₅-神经酰胺与脱脂 BSA 的结合物 (B-22650), 这样可不使用有机溶剂溶解探针即可容易地进行细胞标记。红色荧光的 BODIPY TR 神经酰胺 (D-7540) 可与荧光黄标记的抗体联合应用进行双色免疫荧光标记实验。在正常静止细胞内转运过程中, BODIPY 和 NBD 类似物之间, 染料负载和转运的动力学可能有一些区别。BODIPY FL C₅-神经酰胺是高尔基复合体极好的结构标志, 可通过荧光显微镜观察, 也可在 DAB 显色后用电子显微镜观察。BODIPY FL C₅-神经酰胺的溴化类似物 (BODIPY FL Br₂C₅-神经酰胺, D-7546) 可用来进行 DAB 染料介导的光转化。在位点选择性探针重原子的存在下, 可增加单态氧的产生, 使它们成为更有效的 DAB 光氧化剂。因此, 溴化类似物的应用, 可增强电镜下高尔基复合体的分辨率。BODIPY FL C₅-神经酰胺的其他用途如下: ① 在活细胞标记高尔基复合体; ② 研究神经酰胺对糖蛋白转运的抑制, 研究蛋白质分泌途径和鞘脂类生物合成之间的可能联系; ③ 分离哺乳动物分泌突变体; ④ 研究人类角质细胞分化过程中鞘脂类的分布; ⑤ 观察疟原虫引起的红细胞管泡状膜结构。

BODIPY FL C₅-神经酰胺的荧光强度具有浓度依赖性, 对于显示高尔基复合体是有利的。在高浓度, 非极性的 BODIPY FL 荧光团形成激发态二聚体, 造成荧光团的最大发射波长从 515 nm (绿色) 移位至 620 nm 左右的红色区域。BODIPY FL C₅-神经酰胺的积聚对于在移行高尔基体 (*trans*-Golgi) 区形成激发态二聚体是充足的, 但在周围的胞质则不能形成激发态二聚体, 可用隔离红色发射波长的长波通滤光片选择性地观察高尔基复合体。此外, 通过比率测定技术, 这种双色的特点还可用来进行 BODIPY FL C₅-神经酰胺积聚的定量检测。与 BODIPY FL C₅-神经酰胺一样, 当红色荧光的 BODIPY TR 神经酰胺浓缩于高尔基复合体后, 可形成长波长激发态二聚体, 在这种情况下, 激发态二聚体呈现红外荧光。某些细胞内细菌如衣原体感染的细胞, 在宿主细胞的包涵体膜而不是高尔基复合体出现 BODIPY FL C₅-神经酰胺的积聚 (D-3521)。与 BODIPY FL C₅-神经酰胺联合应用的某些细胞示踪剂 CellTracker 也可选择性地标记细胞内的细菌和寄生虫。BODIPY FL C₅-鞘磷脂 (D-3522)、BODIPY FL C₁₂-鞘磷脂 (D-7711)、BODIPY FL C₅-和 C₁₂-葡萄糖脑苷脂 (D-7548、D-7547) 也可作为高尔基复合体标记物。BODIPY FL C₅-鞘磷脂荧光可发生浓度依赖性的位移, 随着脂类的摄取和通过胞质早期内体的转运, 荧光可从绿色向黄色移位。BODIPY FL C₅-葡萄糖脑苷脂可通过内吞和非内吞途径内化, 与 BODIPY FL C₅-鞘磷脂 (D-3522) 的内化显然不同。采用 BODIPY 神经酰胺和 BODIPY 鞘脂类研究哺乳动物细胞内吞途径的方法, 可参阅 Pagano 及其同事的论文和评述。

6. 哺乳动物和酵母高尔基复合体蛋白抗体

(1) 抗人 Golgin-97 该抗体最初是从患有自身免疫性疾病 Sjögren 综合征的患者血清中分离出来的,

可识别 97 000 道尔顿的蛋白 golgin-97, 为颗粒素 (granin) 家族的成员, 是一种定位于高尔基复合体胞质面的外周膜蛋白。在大多数哺乳动物, 该抗体识别的蛋白是高尔基复合体特异性的, 因此可用于相应细胞高尔基复合体的免疫检测和鉴定 (彩图 14)。

(2) 酵母晚期高尔基组分特异的单克隆抗体 检测酵母晚期高尔基组分, 可使用单克隆抗体抗 Vps10p (A-21274)。酵母 Vps10p 是一种分子量约为 180 000 道尔顿的膜蛋白, 定位于晚期高尔基组分。这种单克隆抗体对于在酵母亚细胞片段中用 Western blot 鉴定晚期高尔基复合体组分和晚期高尔基复合体膜是一种有用的工具, 但是, 由于 Vps10p 抗原丰度较低, 因此该抗体一般不能用免疫组织化学的方法显示高尔基复合体, 除非经过信号放大, 否则不容易观察到。

(3) 特异识别酵母内质网的单克隆抗体 检测酵母内质网, 可采用抗多萜醇磷酸甘露糖合成酶 (Dol-P-Man synthase, Dpmlp) 单克隆抗体 (A-6429)。酵母多萜醇磷酸甘露糖合成酶是一种分子量约 30 000 道尔顿的固有 (integral) 膜蛋白, 定位于内质网, 该单克隆抗体可识别蛋白质的胞质内结构域。

(4) 特异识别酵母内体组分单克隆抗体 检测酵母内体组分, 可采用抗 Pep12p 单克隆抗体 2C3 (A-21273)。酵母 Pep12p, 也称为 Vps6p, 是一种分子量约 37 000 道尔顿的酵母内体蛋白, 属于 t-SNARE 或 syntaxin 家族。Pep12 经一个 C-末端跨膜结构域定位于膜上, 单克隆抗体 2C3 识别的抗原表位位于 N-末端胞质内结构域中。

7. 用于染色高尔基复合体的植物血凝素

(1) 麦胚凝集素和刀豆蛋白 A 在高尔基复合体发现的许多蛋白和脂类都是糖基化的。因此, 在固定的细胞采用植物血凝素交联物染色高尔基复合体尤其有用。彩图 15 显示麦胚凝集素 (WGA) 可作为移行高尔基体 (*trans*-Golgi) 的标志物。刀豆蛋白 A 的荧光交联物也可染色高尔基复合体, 但特异性相对较差。目前可获得麦胚凝集素和刀豆蛋白 A 的荧光标记物的光谱范围, 覆盖了全部可见光和近红外光的光谱。这些物质的 Alexa Fluor 交联物荧光更为明亮, 光稳定性也更好。麦胚凝集素染色试剂盒 (W-7024) 中各含有 1 mg 麦胚凝集素的荧光交联物 (包括 Alexa Fluor 350、Oregon Green 488、四甲基罗丹明和 Texas Red-X)。

(2) *Griffonia simplicifolia* 植物血凝素 GS-II 来源于 *Griffonia simplicifolia* 的植物血凝素 GS-II 是唯一一种可与蛋白质末端非降解的 α -、 β -N-乙酰基-D-glucosaminyl (GlcNAc) 残基高选择性结合的植物血凝素。植物血凝素 GS-II 对于 GlcNAc 的亲合性使得植物血凝素交联物可对中间至移行体 Golgi 进行染色, 该部位是 N-acetylglucosaminyltransferase 活性的部位。少突胶质细胞和神经元的高尔基复合体很容易被荧光 GS-II 交联物染色。在进行高尔基复合体染色时, 可采用绿色的 Alexa Fluor 488 植物血凝素 GS-II 交联物 (L-21415)。

(3) *Helix pomatia* (食用蜗牛) 凝集素 *Helix pomatia* 凝集素 (HPA) 可选择性与末端 -N-acetylgalactosaminyl 残基结合, 该残基是一种加入 O-键的中间糖, O-键与位于顺式高尔基囊的丝氨酸和苏氨酸残基相连, 随后在移行高尔基体 (*trans*-Golgi) 被半乳糖和涎酸取代。HPA 交联物主要用作高尔基复合体的标志, HPA 的绿色荧光 Alexa Fluor 488 交联物 (L-11271) 作为高尔基复合体探针是很好的选择。

第四节 pH 荧光探针

在研究和工业生产中,一些可随 pH 值的变化而显著改变颜色的染料已经广泛应用,包括石蕊、酚酞和酚红。但是,测定活细胞内 pH 需要增强荧光染料的敏感性,与微电极技术相比,可提供更大空间范围的采样能力。这些优点促进了可检测生理学范围 pH 变化的荧光探针的发展,当然,许多同样的荧光 pH 探针也被用来测定无细胞介质的 pH 值。

为进行 pH 定量测定,必须使探针的 pKa 与实验系统的 pH 相匹配。所以,本节分为两部分进行讨论:在近中性 pH 环境使用的 pH 探针和在相对酸性环境使用的 pH 探针。细胞内胞质液 pH 常介于 6.8~7.4 之间,而在细胞的酸性细胞器内 pH 则介于 4.5~6.0 之间。细胞内游离 Ca^{2+} 浓度可迅速改变约 100 倍,但细胞内部 pH 值与细胞内游离 Ca^{2+} 浓度不同,仅部分可发生改变,而且速度相当慢。尽管最好的荧光 pH 探针的视觉变化常常相当小,但已经证明它们是研究细胞内 pH 对不同生理和病理过程作用的有效探针,包括细胞增殖、细胞凋亡、肌肉收缩、恶性肿瘤、多药抗性、离子转运和内环境稳定、入胞作用和 Alzheimer 病。

分子探针公司可提供许多荧光 pH 探针、它们的交联物和测定生物样品 pH 值的试剂。在这些探针中,几种具有独特光学反应和特定定位特点的探针如下:① 可见光激发的 SNARF 和 SNAFL pH 探针能够使研究人员确定生理范围的细胞内 pH,使用双发射或双比率测定技术,是进行流式细胞术和共聚焦激光扫描显微镜检查的重要工具;② LysoSensor 探针和基于俄勒冈绿荧光团的探针可用来评价酸性细胞器的 pH;③ 与葡聚糖偶联的荧光 pH 探针,负载入细胞后,葡聚糖探针留存相当好,不与细胞蛋白质结合,降低了区室化作用。

分子探针公司的 pH 探针按 pKa 值顺序列表如下(表 23-23):

表 23-23 pH 探针家族

母体荧光团	pH 范围	标准测定
SNAFL 探针	7.2~8.2	490/540 nm 激发比率或 540/630 nm 发射比率
SNARF 探针	6.0~8.0	580/640 nm 发射比率
HPTS (pyranine)	7.0~8.0	450/405 nm 激发比率
BCECF	6.5~7.5	490/440 nm 激发比率
荧光黄和羧基荧光黄	6.0~7.2	490/450 nm 激发比率
LysoSensor Green DND-189	4.5~6.0	520 nm 单发射
俄勒冈绿染料	4.2~5.7	510/450 nm 激发比率或 490/440 nm 激发比率
LysoSensorYellow/Blue DND-160	3.5~6.0	450/510 nm 发射比率

一、近中性 pH 应用的探针

(一) 荧光黄和荧光黄衍生物

荧光黄和许多荧光黄衍生物显示出多样的 pH 依赖性电离平衡,酚和荧光黄的羧基酸性功能基团在 pH 为 9 以上的水溶液中几乎完全离子化。

荧光黄双阴离子的酸首先使酚(pKa 约 6.4)质子化产生荧光黄单阴离子,而后羧酸化(pKa <5)产生中性荧光黄,如进一步酸化则产生荧光黄阳离子(pKa 约 2.1)。仅荧光黄的单阴离子和双阴离子是有荧光的,光量子产率分别为 0.37 和 0.93,然而,据报道中性或阳离子荧光黄产生来自阴离子的发射,有

效量子产率分别为 0.31 和 0.18。进一步平衡形成无色、无荧光的内酯，内酯在 pH 为 5 以上的水溶液中不能形成，在丙酮溶剂中主要形式是中性荧光黄。荧光黄 pH 依赖的吸收光谱在质子化荧光黄形成后显示出明显的蓝移，光吸收率明显降低。可是，即使在酸性溶液中，大多数荧光黄衍生物的荧光发射光谱是双阴离子为主形成的，仅少量来自于单阴离子。所以，由接近双阴离子吸收峰值 490 nm 的激发引起的发射光谱波长和形状对 pH 具有相对不依赖性，但是荧光强度在酸性 pH 显著降低。荧光黄的化学取代造成最大吸收和荧光发射波长的移位，并改变染料的 pKa。

1. 荧光黄及其乙酰乙酸盐 细胞通透性的荧光黄乙酰乙酸盐 (FDA, F-1303) 偶尔用来测定细胞内 pH，也可用来研究细胞粘附，与 propidium iodide (P-1304、P-3566、P-21493) 结合应用可确定细胞存活性。细胞内 FDA 水解形成的荧光黄 (F-1300) 可快速从细胞漏失。

细胞在 4 $\mu\text{mol/L}$ 染色液 [含有 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改良 Eagle 培养液 (DMEM⁺)] 中，37 °C 孵育，孵育 30 min 后，细胞样品立即用流式细胞仪进行分析，确定每个细胞在 0 h 的平均荧光强度 (0 h)；留存的细胞样品离心洗涤 2 次，在悬浮于 DMEM⁺，37 °C 保持 2 h 后再用流式细胞仪进行分析，在这些样品中，相对于 0 h 小时每个细胞平均荧光强度的降低提示 2 h 的孵育过程中细胞内染料渗漏的程度。因此，其他细胞通透性染料如 BCECF 和钙黄绿素 AM 酯现在是进行细胞内 pH 测量和进行细胞存活性分析的首选。F-1303 即 fluorescein diacetate (FDA)，分子式为 $\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{O}_7$ ，分子量为 416.39 道尔顿，CAS 编号 596-09-8。

2. 羧基荧光黄及其细胞通透性酯 荧光黄从细胞内的快速渗漏使得它定量测定细胞内的 pH 非常困难，因为染料渗漏造成的荧光降低不容易与酸化作用引起的荧光减弱区分，羧基荧光黄乙酰乙酸盐 (CFDA, C-195) 用来进行细胞内 pH 测定可部分克服这种缺点。CFDA 对大多数细胞膜有适当的通透性，在细胞内被非特异性酯酶水解形成羧基荧光黄 [5 (6) -FAM, C-194; C-1904]，它具有 pH 依赖的光谱反应与荧光黄非常相似。与荧光黄相比，羧基荧光黄含有额外的负电荷，因此更容易在细胞留存。CFDA (C-195) 的混合同分异构体适合进行细胞内 pH 测量，因为羧基荧光黄的单一同分异构体显示基本相同的 pH 依赖光谱，pKa 约 6.5。进行实验需要纯化的同分异构体，羧基荧光黄单一同分异构体 (C-1359、C-1360) 和 CFDA 单一同分异构体 (C-1361、C-1362) 都可得到。CFDA 的 AM 酯 (5-CFDAAM, C-1354) 是电中性的，容易进行细胞负载，在细胞内酯酶水解后，这种 AM 酯也产生羧基荧光黄。羧基荧光黄是荧光素衍生物的一种，5-FAM 较 6-FAM 更经常使用。Carboxyfluorescein-5-succinimidyl ester，即 5-FAM (NHS) 广泛存在于荧光标记试剂盒。与 FITC 相比，FAM 与氨基反应更快，产物也更稳定，但 FITC 结合蛋白的量更大且进程更易于控制。FAM 也适用氩离子激光器的 488 nm 光谱线，具有荧光黄衍生物的普遍特性，在水中稳定。使用羧基荧光黄仍被用来测定细胞内 pH，但应注意 SNARF、SNAFL 和 BCECF 染料的光谱性质和 pKa 特点更适合进行 pH 研究。羧基荧光黄也常作为极性示踪剂使用，CFDA 和它的 AM 酯可用来监测细胞存活性、细胞凋亡和细胞粘附。5-FAM 主要应用于 DNA 自动测序中，标记其中的 d/ddCTP (PE 公司)，也经常用于 PCR 产物定量、核酸探针等。

3. BCECF 及其 AM 酯 尽管羧基荧光黄在细胞内的留存比荧光黄好，但它的 pKa 约 6.5，比大多数细胞的胞质液 pH (pH 约 6.8~7.4) 低。所以对于检测 pH 为 7 以上的 pH 变化并不理想。自从 1982 年 Roger Tsien 使用以来，极性荧光黄衍生物 BCECF (B-1151) 和它的膜通透性 AM 酯 (B-1150、B-1170、B-3051, BCECF) 已广泛用来测定细胞内 pH，也可使用流式细胞分析，用 BCECF 估计细胞内 K^+ 浓度。在 pH 7~8 时，BCECF 的 4~5 个负电荷可延长在细胞内的存留时间 (图 23-12)，它的 pKa 为 6.98 与标准的细胞内 pH 测定相同。

与荧光黄和羧基荧光黄一样，BCECF 酚盐阴离子 (碱性) 形式的吸收光谱出现红移，相对于其质子化 (酸性) 形式摩尔吸光系数增加，在 505 nm 激发时，BCECF 的发射光谱可出现很小的 pH 依赖的移位。

BCECF 被作为双激发比率 pH 探针使用。用比率测定方法可显著降低由于浓度、光路长 (path length)、渗漏、光漂白的变化所造成的信号错误。用 BCECF 进行细胞内 pH 测定，可通过确定 pH 依赖

的发射强度比率（在 535 nm 检测）完成，即染料在 490 nm 左右激发的荧光强度与在等吸光点 440 nm 左右激发的荧光强度比率。因为 BCECF 在 440 nm 的光吸收十分弱，波长增加至约 450 nm 可使比率成像的信噪比改善。与其他细胞内 pH 探针一样，BCECF 荧光反应的原位校准通常使用 10~50 $\mu\text{mol/L}$ 尼日利亚菌素（nigericin, N-1495），并用 100~150 mmol/L K^+ 平衡细胞内外 pH。

测定细胞内 pH，要将活细胞悬液或贴壁细胞在 1~10 $\mu\text{mol/L}$ 的 BCECF AM 酯溶液中进行孵育负载。合成的 BCECF AM 酯至少有三种不同的分子，但所有三种形式（图 23-13）都可转化为相同的产物 BCECF 酸（B-1151），可被细胞内的酯酶水解。

尽管容易制备纯化的三乙酰甲基酯形式（图中 I 型），但一些研究人员发现用 II 型和 III 型内酯的混合物负载细胞更有效，因此，常用的商品化的 BCECF AM 主要是 II 型和 III 型内酯的混合物，标准构成比例为 45:55，可经 HPLC、NMR 和物质光谱测定法确定。BCECF 的 AM 酯包装规格为 1 mg/瓶（B-1150）、50 $\mu\text{g} \times 20$ （B-1170），溶解于无水 DMSO 1 mg/ml 溶液（约 1.6 mmol/L）（B-3051），使用小包装可避免吸潮而引起的变质。应用 BCECF 进行的研究包括：① $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交换；② K^+/H^+ 交换；③ 乳酸盐转运和代谢；④ Na^+/H^+ 交换；⑤ $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换；⑥ NH_4^+ 转运；⑦ 细胞凋亡；⑧ 细胞毒作用；⑨ 多药抗性；⑩ 细胞体积改变；⑪ 成骨细胞和破骨细胞溶胶 pH 调节；⑫ 吞噬作用。

细胞非通透性的 BCECF 酸（B-1151）对于测定上皮细胞单层细胞间间隙的 pH、正常和肿瘤组织间隙的 pH、分离细胞碎片的 pH 是有用的。可通过微注射负载入细胞，也可通过电穿孔或使用细胞负载试剂进行负载。BCECF 游离酸可在 pH 约为 2 的条件下简单孵育而负载入细菌细胞，也可得到 BCECF 的葡聚糖交联物（D-1878、D-1880）。B-1151 即 2',7'-bis - (2-carboxyethyl) -5 - (and -6) - carboxyfluorescein (BCECF acid)，分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{11}$ ，分子量为 520.45 道尔顿，CAS 编号/名称为 85138-49-4；B-1150 即 2',7'-bis - (2-carboxyethyl) -5 - (and -6) - carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester (BCECF, AM)，CAS 编号/名称为 117464-70-7。

4. 荧光黄磺酸及其乙酰乙酸盐 荧光黄-5-(6)-磺酸（F-1130）比羧基荧光黄极性更强，因此，一旦进入细胞或脂质体则可相当好的留存。某些细胞可被 5-磺基荧光黄乙酰乙酸盐（SFDA, S-1129）直接负载，在活的人成纤维细胞高尔基复合体移行区（trans-Golgi）可直接进行比率测量，可将荧光黄磺酸和磺基罗丹明 101（S-359）同时用微注射

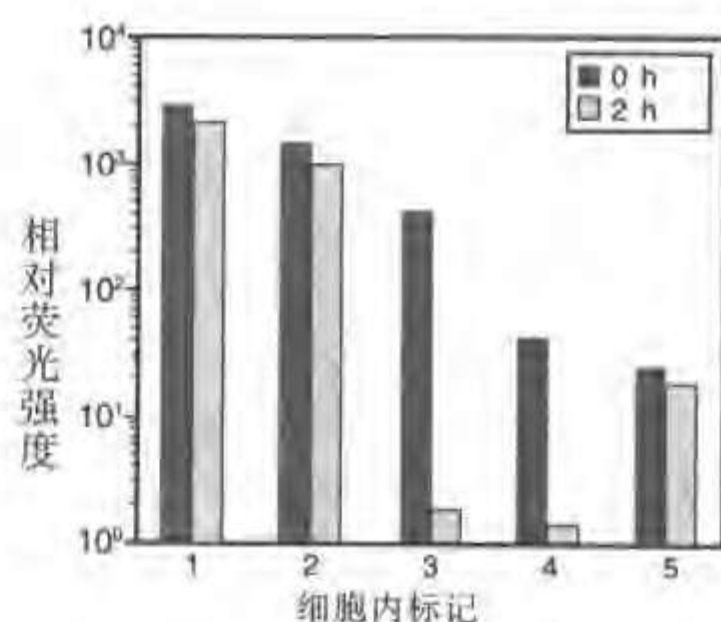


图 23-12 细胞内标志染料的负载和留置
人淋巴样细胞系细胞（CePa）用下列细胞通透性的荧光黄 AM 或乙酸盐衍生物负载。
1: 钙黄绿素 AM (C-1430, C-3099, C-3100); 2: BCECF AM (B-1150); 3: 荧光黄乙酰乙酸盐 (FDA, F-1303); 4: 羧基荧光黄乙酰乙酸盐 (CFDA) (C-1354); 5: CellTracker Green CMFDA (5-氯甲基荧光黄乙酰乙酸盐, C-2925, C-7025)

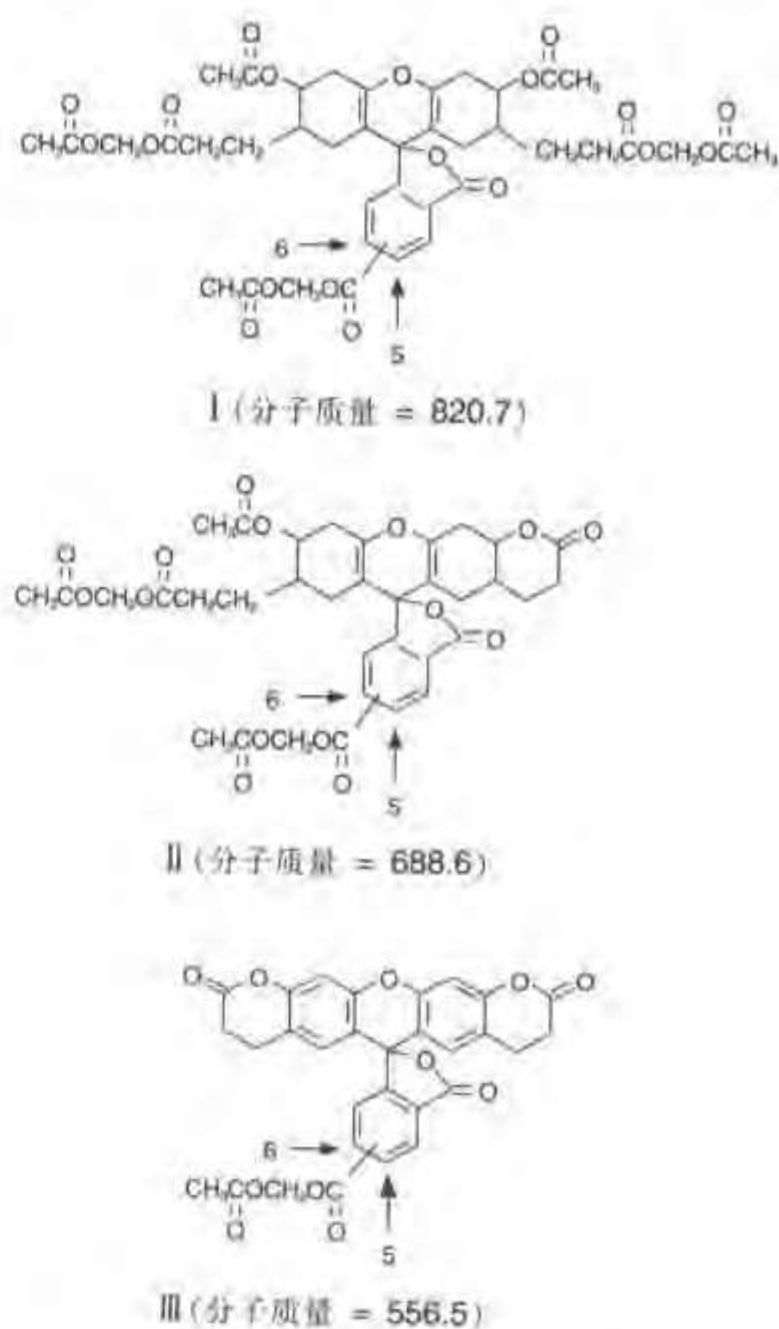


图 23-13 BCECF AM 酯（B-1150、B-1170、B-3051）的结构

负载入脂质体。

5. 化学反应性荧光黄乙酰乙酸盐 克服上述 pH 探针 (包括 BCECF) 细胞渗漏问题的一种常用方法是通过探针与细胞内组分交联而使探针固定。CellTracker Green CMFDA 的氯甲基衍生物 (C-2925、C-7025) 和氯甲基 SNARF-1 (C-6826) 是进行长期细胞示踪和 pH 研究最有潜能的试剂。在许多类型的细胞, CMFDA 的弱巯基反应性氯甲基半族 (moiety) 可与细胞内硫醇类 (包括谷胱甘肽和蛋白质) 反应, 可产生很好留存的产物。CMFDA 交联物的乙酰基被细胞内酯酶裂解可产生一种可保持荧光黄 pH 依赖光谱特点的交联物。相似地, 胺反应性 CFDA 的琥珀酰亚胺基酯, 也称为 CFSE (C-1157) 可用来进行活细胞长时间 pH 研究, 产生一种 pH 敏感的具有羧基荧光黄特点 of 的交联物。因为它本质上更具有反应活性, CFDA 的琥珀酰亚胺基酯比 CMFDA 更可能与细胞外表面位点的反应。

6. 羧基萘荧光黄 (Carboxynaphthofluorescein) 羧基萘荧光黄 (C-652) 具有 pH 依赖的红色荧光 (在 pH>9 时, 最大激发/发射波长约为 598/668 nm), 其 pKa 值相当高约为 7.6。羧基萘荧光黄的长波长荧光 pH 依赖的光谱已经被开发制造光纤 pH 传感器。这种长波长 pH 探针的膜通透性乙酰乙酸盐 (C-13196) 可被动负载入细胞内。

(二) SNARF 和 SNAFL pH 探针

Seminaphtharhodafuors (SNARF 染料) 和半萘并荧光黄 (seminaphthofluorescein, SNAFL 染料) 是可见光激发的荧光 pH 探针。SNARF 和 SNAFL 探针都具有双激发和双发射性质, 因此尤其适合共聚焦激光扫描显微镜、流式细胞仪、微孔板读数仪使用, SNARF 染料的双发射性质使这些探针成为光纤 pH 传感器的首选探针。荧光团可被氩离子激光的 488 nm 或 514 nm 的谱线激发, 对生理学范围内的 pH 值敏感。SNARF 染料也有葡聚糖交联物。

1. 羧基 SNARF-1 染料及其细胞通透性酯 羧基 SNARF-1 染料 (C-1270) 很容易负载入细胞, 它的细胞通透性 AM 乙酸酯 (C-1271、C-1272) 在 37°C 条件下 pKa 值为 7.3~7.4, 室温条件下则为 7.5。因此, 羧基 SNARF-1 测定的 pH 变化在 pH 7~8 之间。与荧光黄和 BCECF 一样, 羧基 SNARF-1 pH 探针的吸收光谱在它的酚取代基去质子化后向较长波长移位。

与基于荧光黄的探针相反, 羧基 SNARF-1 也显示出显著的 pH 依赖的发射光谱移位, 在酸性和碱性环境下分别从橙黄色移位至深红色。这种 pH 依赖性使这种染料具有两种发射波长的荧光强度比率, 标准的为 580 nm 和 640 nm, 可用来进行 pH 值的定量测定。在实际应用中, 常希望羧基 SNARF-1 荧光的检测偏向较弱的荧光酸性形式, 可通过使用介于 488 nm 和 530 nm 左右等吸光点的激发波长得到, 产生两种发射比率组分的均衡的信号 (彩图 16)。当用 488 nm 激发时, 羧基 SNARF-1 显示发射等吸光点约 610 nm, 得到的荧光信号比用 514 nm 激发获得的荧光信号弱。当使用某些共聚焦激光扫描显微镜装配的氩-氦激光器的 568 nm 谱线激发时, 羧基 SNARF-1 显示随着 pH 的增加 640 nm 的荧光强度增强, 发射等吸光点在 585 nm。与其他的离子探针一样, 细胞内环境可造成羧基 SNARF-1 的光谱性质和 pKa 显著变化, 因此实验时必须相应的实验条件下进行校准。

羧基 SNARF-1 的光谱可与 fura-2、indo-1、fluo-3、fluo-4、钙绿、俄勒冈绿 488 APTA Ca^{2+} 探针很好区分, 因此它们可同时应用测定细胞内 pH 和 Ca^{2+} 。

羧基 SNARF-1 可与 Na^{+} 探针 SBFI (S-1262、S-1263、S-1264) 联合应用, 同时检测心脏线粒体 pH 和 Na^{+} 的变化。羧基 SNARF-1 相对长波长的激发和发射特点容易对自发荧光细胞进行研究, 还可使用阴离子转运抑制剂 DIDS (D-337)、阿米洛利 (amiloride) 衍生物、笼锁探针进行研究, 其他的需要 UV 光激发的细胞功能改性剂 (modifier) 也可同时应用。另外, 羧基 SNARF-1 具有近 490 nm 激发和在 600 nm 以上观察红色荧光的能力, 可作为 Ca^{2+} 不敏感的参考染料和其他的非比率 Ca^{2+} 探针 fluo-3、fluo-4、钙绿-2 一起进行细胞内 Ca^{2+} 的比率测定。在用羧基 SNARF-1、AM 乙酸酯孵育细胞数小时后, 染料由于区室化而选择性滞留可原位测定线粒体 pH (彩图 17)。

C-1270 即 5- (and-6) -carboxy SNARF-1, 分子式为 $\text{C}_{27}\text{H}_{19}\text{NO}_6$, 分子量为 453.45 道尔顿, CAS 编

号 126208-12-6; C-1271 即 5-(and-6)-carboxy SNARF-1, acetoxymethyl ester, acetate, 分子式为 $C_{32}H_{25}NO_9$, 分子量为 567.55 道尔顿, CAS 编号/名称为 126208-13-7; C-1272 即 5-(and-6)-carboxy SNARF-1, acetoxymethyl ester, acetate, 分子式为 $C_{32}H_{25}NO_9$, 分子量为 567.55 道尔顿, CAS 编号/名称为 126208-13-7。

2. SNARF-4F 和 SNARF-5F 染料 尽管羧基 SNARF-1 探针拥有出色的光谱性质, 但它的 pK_a 约 7.5, 这对于某些细胞细胞内 pH 的测量可能太高了。为定量测定标准胞质液范围 (pH 约 6.8~7.4) 的 pH 变化, 建议使用 SNARF-5F 羧酸, 其 pK_a 值约 7.2, 是具有最佳光谱特点的评估胞质液 pH 的探针 (图 23-14), SNARF-4F 羧酸对酸性 pH 更敏感 (pK_a 约 6.4), 保留双发射光谱性质 (图 23-15)。

SNARF-4F 和 SNARF-5F 都可进行双激发和双发射比率 pH 测量, 与 SNARF-1 比率测量使用的仪器相匹配。SNARF-4F 和 SNARF-5F 可以是游离羧酸 (S-23920、S-23922) 或细胞通透性的乙酰乙酸盐衍

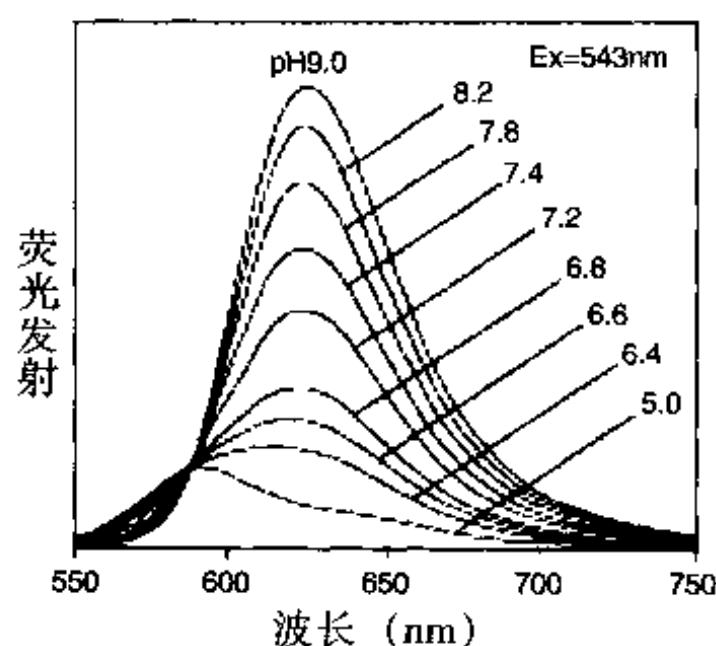


图 23-14 作为 pH 函数的 SNARF-5F (S-23922) 荧光发射光谱

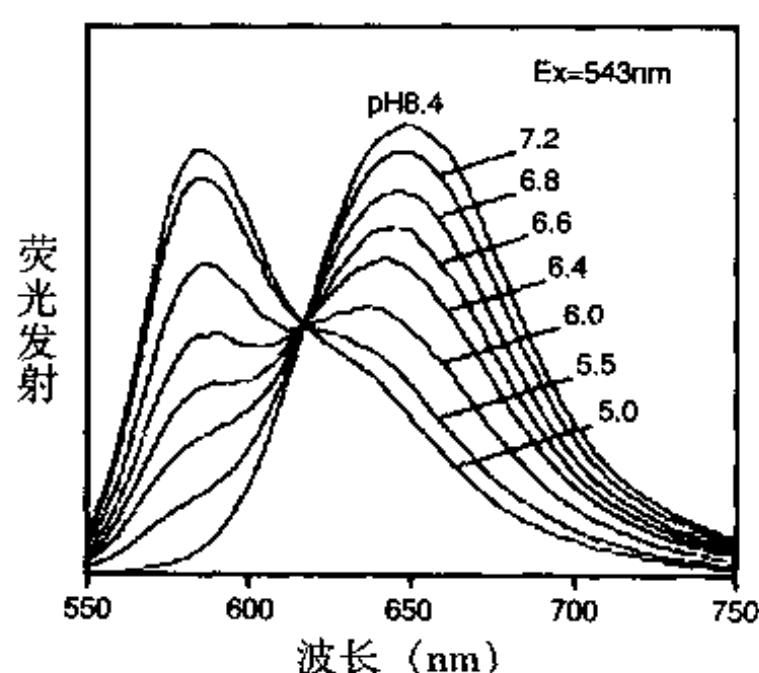


图 23-15 SNARF-4F (S-23920) 的荧光发射光谱。显示 pH 依赖的光谱移位, 是这种和其他 SNARF pH 探针的特征

生物 (S-23921、S-23923)。S-23920 即 SNARF-4F 5-(and-6)-carboxylic acid, 分子式为 $C_{27}H_{18}FNO_6$, 分子量为 471.44 道尔顿; S-23922 即 SNARF-5F 5-(and-6)-carboxylic acid, 分子式为 $C_{27}H_{18}FNO_6$, 分子量为 471.44 道尔顿; S-23921 即 SNARF-4F 5-(and-6)-carboxylic acid, acetoxymethyl ester, acetate, 分子式为 $C_{32}H_{24}FNO_9$, 分子量为 585.54 道尔顿; S-23923 即 SNARF-5F 5-(and-6)-carboxylic acid, acetoxymethyl ester, acetate, 分子式为 $C_{32}H_{24}FNO_9$, 分子量为 585.54 道尔顿。

3. 氯甲基 SNARF-1 乙酸盐 5-(6)-氯甲基 SNARF-1 乙酸盐 (C-6826) 含有可和细胞内硫醇类起温和反应的氯甲基, 形成的加成化合物可改进 SNARF 荧光团的细胞内存留时间。与 CellTracker Green CMFDA 一样, 这种交联物在细胞留存的改进可允许对细胞内 pH 进行长时间监测。与 CellTracker 染料一样, 它也可以单纯作为长时间细胞示踪剂使用。C-6826 即 5-(and-6)-chloromethyl SNARF-1, acetate, 分子式为 $C_{29}H_{22}ClNO_5$, 分子量为 499.95 道尔顿。

4. 羧基 SNAFL-1 与荧光黄和它的衍生物相反, SNAFL-1 pH 探针的酸性形式比它们的碱性形式具有更高的荧光量子产率。SNAFL 探针可用于双发射 (图 23-16) 或双激发 (图 23-17) 比率 pH 测量, 也可应用在基于荧光寿命的 pH 和 CO_2 传感器和光纤 pH 传感器。羧基 SNAFL-1 可以是游离酸形式 (C-1255), 也可以是细胞通透性的乙酰乙酸盐衍生物 (C-1256)。C-1255 即 5-(and-6)-carboxy SNAFL-1, 分子式为 $C_{25}H_{14}O_7$, 分子量为 426.38 道尔顿, CAS 编号/名称为 151898-26-9; C-1256 即 5-(and-6)-carboxy SNAFL-1, diacetate, 分子式为 $C_{29}H_{18}O_9$, 分子量为 510.46 道尔顿, CAS 编号/名称为 153314-

88-6。

(三) 8-羟芘基 (Hydroxypyrene) -1,3,6-三磺酸 (HPTS)

8-羟芘基-1,3,6-三磺酸 (HPTS, 也称为 pyranine, H-348) 是一种价格便宜的、高度水溶性的、膜非通透性 pH 探针, 在水性缓冲液中 pK_a 值为 7.3 左右。据报道在某些细胞的胞质液中 HPTS 的 pK_a 可上升至 7.5~7.8。与基于 SNARF、SNAFL、荧光黄染料的探针不同, HPTS 探针没有膜通透型。因此 HPTS 必须通过微注射、电穿孔、脂质体介导的递送或经 ATP 门控的离子通道导入细胞。HPTS 显示出 pH 依赖的吸收光谱移位 (图 23-18), 可使用 450/405 nm 的激发比率进行比率测量。

独特的 pH 依赖的光谱性质、高水溶性和低价格使 HPTS 应用及其广泛。包括: ①脂质体和细胞质子渗透性检测; ②研究 pH 介导的细胞内 Ca^{2+} 变化; ③氧和二氧化碳、氨、酶活性光纤传感器; ④检测生物能关联的质子传递过程; ⑤测量溶酶体和其他细胞器的酸度; ⑥检测膜融合和溶解; ⑦追踪入胞作用; ⑧检测脂质体包裹的分子靶细胞内的递送。

也可获得 HPTS 的葡聚糖交联物 (D-7179)。

二、酸性 pH 使用的探针

真核细胞含有不同酸度的区室, 如生物分子通过受体介导的内吞作用 (吞饮) 或吞噬作用进入细胞, 首先经过低 pH 的特殊细胞器进行处理, 如植物细胞液泡和精子顶体本质上都是酸性的。区室内的低 pH 可激活酶和其他蛋白质的功能, 如在中性 pH 转铁蛋白释放铁时相当缓慢, 有利于细胞代谢。异常的溶酶体或内体的酸化与许多病理状态有关, 据报道某些肿瘤细胞的溶酶体具有较低 pH, 而其他肿瘤细胞则含有较高 pH 的溶酶体。

用来检测酸性细胞器和追踪通过酸性细胞器运输的荧光 pH 探针必须具有不同的荧光反应, 包括具有比以上描述的 pH 探针更低的 pK_a , 并且, 与大多数用于测定胞质液的 pH 探针不同, 酸性细胞器的 pH 探针本质上不需要膜通透性, 而是更常以共价键结合在大生物分子上, 通过细胞固有的机制通过酸性细胞器主动摄取和处理。

(一) LysoSensor 探针

LysoSensor 探针是弱碱, 质子化的结果可在酸性细胞器选择性浓集。这种质子化也减轻了光诱导电子传递 (photo-induced electron transfer, PET) 引起的染料荧光淬灭, PET 是通过染料的弱碱基侧链进行的。因此, 与大多数其他 pH 探针不同, LysoSensor 染料在酸性环境中荧光更强。

因为 LysoSensor 探针的聚集, 可引起溶酶体的碱化, 因此 pH 的测量应在细胞用染料孵育 ($37^{\circ}C$, 1~5 min) 后快速测定。

LysoSensor Yellow/Blue DND-160 (L-7545) 当用接近它的激发等吸光点 (约 360 nm) 的光照明时, 在酸性环境中可造成 pH 依赖的发射光谱移位至较长波长; 当用接近它的发射等吸光点 (约 490 nm) 的波长检测时, 则产生 pH 依赖的激发光谱移位。利用这些性质可进行溶酶体 pH 双发射比率成像 (彩图

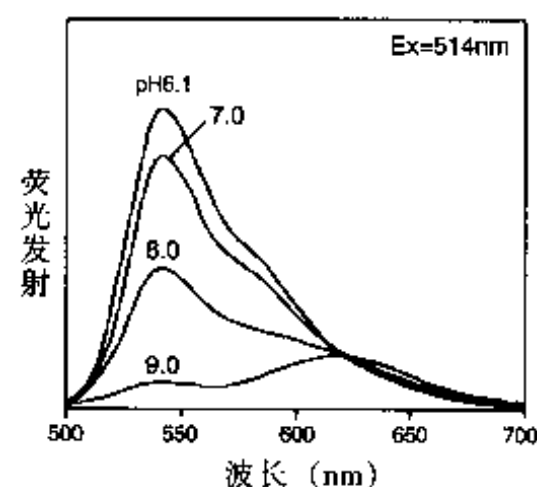


图 23-16 在 514nm 激发时, 羧基 SNAFL-1 (C-1255) pH 依赖的发射光谱

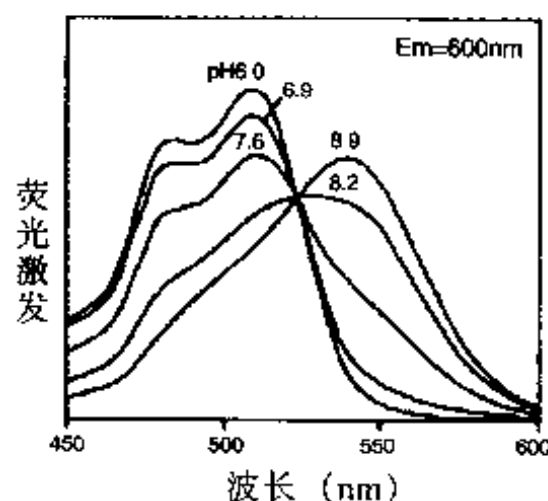


图 23-17 羧基 SNAFL-1 (C-1255) pH 依赖的激发光谱, 发射波长为 600nm

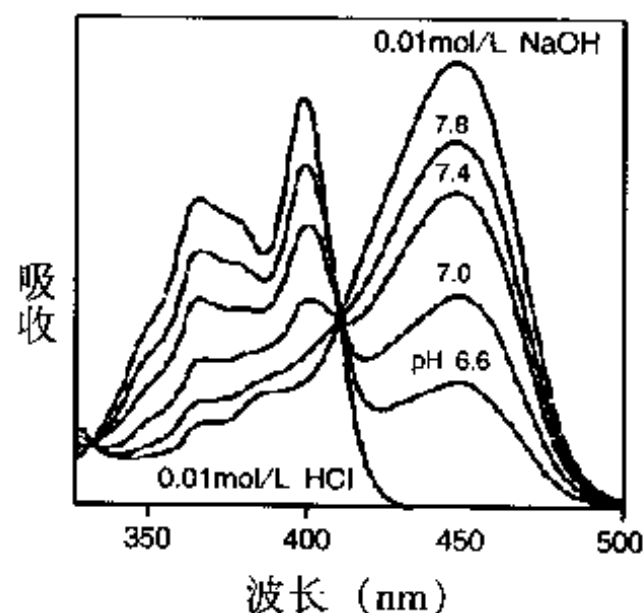


图 23-18 8-羟芘基-1,3,6-三磺酸 (HPTS, H-348) pH 依赖的吸收光谱

18) (发射 450/510 nm, 激发 365 nm)。

LysoSensor Yellow/Blue DND-160 的黄色荧光可用来识别溶酶体, 在药物抗性细胞系它是 anthracycline 的聚集部位。LysoSensor Yellow/Blue 染料与分子量 10 000 道尔顿葡聚糖交联物 (L-22460) 也可得到。

蓝色荧光的 LysoSensor Blue 和绿色荧光的 LysoSensor Green 探针最佳 pH 敏感性为酸性或中性范围 (pKa) 约 5.2 或 7.5 左右, 表 23-24。

因为 pKa 值低, LysoSensor Blue DND-167 (L-7533) 和 LysoSensor Green DND-189 (L-7535) 除

表 23-24 LysoSensor 探针 pH 反应概要

产品编号	LysoSensor 探针	吸收/发射波长 * (nm)	pKa†	有效的 pH 范围†
L-7533	LysoSensor Blue DND-167	373/425	5.1	4.5-6.0
L-7534	LysoSensor Green DND-153	442/505	7.5	6.5-8.0
L-7535	LysoSensor Green DND-189	443/505	5.2	4.5-6.0
L-7545	LysoSensor Yellow/Blue DND-160	384/540‡ 329/440§	4.2	3.5-6.0

* pH 为 5 时的最大吸收和荧光发射波长, 数值在细胞环境可能有些变化; † 所有 pKa 值都是在体外测定的, 在细胞该数值可能不同; ‡ 在 pH = 3 条件下; § 在 pH = 7 时

非在酸性细胞器内, 否则几乎无荧光, 而 LysoSensor Green DND-153 (L-7534) 具有明亮荧光, 甚至在中性 pH 也是如此。LysoSensor Green DND-189 可用来监测 bafilomycin A₁ 造成的轴突囊泡跨膜 pH 梯度的逸散作用。

(二) 俄勒冈绿和二氯荧光黄衍生物

将氟基引入荧光黄染料可使酚基的 pKa 降低 5 或更多, 在近中性 pH 范围对 pH 变化不敏感, 然而, 这些氟化的荧光黄染料对中等程度酸性溶液的 pH 仍然敏感, pKa 值约 4.7。

除 pKa 值较低外, 俄勒冈绿染料 pH 依赖的光谱特征与其他基于荧光黄的染料光谱非常相似, 可与 BCECF 一样进行双激发比率测量。俄勒冈绿 514 羧酸 (O-6138)、俄勒冈绿 488 羧酸 (O-6146) 和 5- (6) -羧基-2',7'-二氯荧光黄 (C-368) 不容易进入细胞, 但可以作为入胞作用的液相标志。这些氟化和氯化的荧光黄衍生物在交联物形成中最有用, 交联物可被酸性细胞器吞入和处理。俄勒冈绿 488 和俄勒冈绿 514 染料的葡聚糖交联物在后面详述。二氯荧光黄细胞通透性乙酰乙酸盐衍生物 (carboxy-DCFDA, C-369) 和二氯荧光黄细胞通透性乙酰乙酸盐衍生物 (carboxy-DFFDA, O-6151) 也有出售。羧基 DCFDA 可用来测定酸性细胞器、胞质液、植物细胞和酵母液泡的 pH, 对用羧基 DFFDA 负载米和玉米根毛细胞, 暴露于氨后, 液泡 pH 调整 (rectification) 的机制已经进行了研究。O-6138 即 Oregon Green 514 carboxylic acid, 分子式为 C₂₂H₉F₃O₇S, 分子量为 512.36 道尔顿; O-6146 即 Oregon Green 488 carboxylic acid, 分子式为 C₂₁H₁₀F₂O₇, 分子量为 412.30 道尔顿; C-368 即 5- (and -6) -carboxy-2',7'-dichlorofluorescein, 分子式为 C₂₁H₁₀Cl₂O₇, 分子量为 445.21 道尔顿, CAS 编号/名称为 111843-78-8; C-369 即 5- (and -6) -carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (carboxy-DCFDA), 分子式为 C₂₅H₁₄Cl₂O₉, 分子量为 529.29 道尔顿, CAS 编号/名称为 127770-45-0; O-6151 即 Oregon Green 488 carboxylic acid diacetate (carboxy-DFFDA), 分子式为 C₂₅H₁₄F₂O₉, 分子量为 496.38 道尔顿, CAS 编号/名称为 195136-74-4。

(三) 在酸性环境中应用的其他 pH 探针

1. 9-氨基-6-氯-2-甲氧基吖啶 (9-Amino-6-Chloro-2-Methoxyacridine) 核酸染料 9-氨基-6-氯-2-甲氧基吖啶 (ACMA, A-1324) 显然可与激活状态的膜结合, 在 pH 梯度形成后荧光即淬灭, 这种探针与膜电位敏感的碳花青类似。ACMA 主要用来检测大肠杆菌 ATP 合成酶和酵母菌液泡 H^+ -ATPase 的质子转运活性。

2. HPTS 尽管 HPTS (H-348) 的 pKa 约 7.3, 并且主要作为近中性 pH 范围的 pH 探针, 但它具有下列几种明显的优点, 可进行内体/溶酶体途径中监控细胞器内的 pH: ① 由它的磺酸基可产生较高的极性性质防止细胞内的跨膜渗漏; ② 可有效被液相吞饮摄取并容易实现; ③ 激发比率确定, 可进行 pH 测量, 而不受囊泡大小和探针浓度的影响; ④ 精确的校准容许 pH 值低至 4.4 也可正确测量; ⑤ HPTS 无毒, 对正常生理状态无干扰。

HPTS 可通过微注射、电穿孔、脂质体介导的递送或经 ATP 门控的离子通道导入细胞 (见前)。HPTS 还可经膜片钳的吸管负载入细胞。据报道其光毒性作用比 BCECF 小。HPTS 的激光激发可引起亚微秒的光子脉冲和局部酸化。

三、pH 探针交联物

(一) pH 探针葡聚糖

前面讨论的 pH 探针的 pH 敏感特性在与葡聚糖交联后通常不受显著影响, 但是, 这些相对惰性的多糖与 pH 探针偶联后可改变探针的其他几种性质: ① 交联物的水溶性较高, 因此必须通过微注射、膜片钳技术、吞饮作用、脂质体融合或使用细胞负载试剂 (I-14402) 进行负载; ② 一旦负载, 葡聚糖则在活细胞长时间存留 (这些葡聚糖平均分子量至少在 3 000 道尔顿以上) 将无法通过缝管连接; ③ 葡聚糖的附着将显著降低探针区室化的可能性, 使用细胞通透性 AM 酯衍生物则可以引起区室化, 因此可避免与此相关的问题。

常用 pH 探针葡聚糖的特点列表如下 (表 23-25):

表 23-25 常用 pH 探针葡聚糖特点

染料	产品编号	pKa *	测量波长	应用
SNARF	D-3303, D-3304	7.5	580/640 nm 发射比率, 在 514 nm 或 488 nm 激发	是进行发射比率测量的最好交联物, 光谱与羧基 SNARF-1 相似
HPTS	D-7179	7.0	470/380 nm 激发比率, 在 530 nm 检测	葡聚糖交联物光谱相对于游离染料显著移位约 20 nm
BCECF	D-1878, D-1880	7.0	490/440 nm 激发比率, 在 530 nm 检测	是进行激发比率测量的最好交联物, 光谱与 BCECF 相似
Fluorescein	D-1821D-1823, D-1844,D-3305	6.4	490/450 nm 激发比率, 在 520 nm 检测	酸性细胞器摄取后, 荧光强烈淬灭
Fluorescein and tetramethylrhodamine	D-1950, D-1951	6.4	495/555 nm 激发比率, 在 580 nm 检测	交联物可组成 pH 敏感的和 pH 不敏感的荧光染料
Oregon Green 488	D-7170, D-7172	4.7	490/440 nm 激发比率, 在 520 nm 检测	好的光稳定性对于测量溶酶体和晚期内体最佳的 pH 敏感性
Oregon Green 514	D-7176	4.7	510/450 nm 激发比率, 在 530 nm 检测	出色的光稳定性对于测量溶酶体和晚期内体最佳的 pH 敏感性
LysoSensor Yellow/Blue	L-22460	4.2	340/400 nm 激发比率, 在 520 nm 检测; 450/510 nm 发射比率, 在 365 nm 检测	有双激发或双发射比率测量选择权对于测量溶酶体和晚期内体最佳的 pH 敏感性

* pKa 值是游离染料确定的。葡聚糖交联物的实际值可能有 ± 0.3 pH 单位的差别, 而且不同批号也有差别。理论是 520/580 nm 发射比率测量 (用 495 nm 激发) 也是可能的, 但是由于荧光共振能量传递, 因此反应复杂。

1. 测定近中性 pH 的探针葡聚糖 分子量 10 000 道尔顿和分子量 70 000 道尔顿的 BCECF 葡聚糖 (D-1878、D-1880) 是测定近中性 pH 的重要双激发 pH 探针交联物。BCECF 葡聚糖标记的 Swiss 3T3 细胞已经显示可产生更稳定的荧光信号, 降低探针的区室化作用, 对光诱导的损伤的抵抗性比 BCECF AM

标记的细胞强 10 倍。分子量 10 000 道尔顿的 BCECF 葡聚糖 (D-1878) 已经用来监测发育过程中细胞内 pH 的增加, 并用来测定人肺组织粘膜下层腺体的分泌。使用 BCECF 葡聚糖结合 fura 葡聚糖 (F-3029) 可研究绿藻类细胞质的 $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ 缓冲作用。

羧基 SNARF-1 pH 探针葡聚糖交联物 (D-3303、D-3304) 可微注射入藻 *Pelvetia fastigata* 根样 (rhizoid) 细胞, 使用比率成像技术测定与极性尖生长有关的 pH 梯度。SNARF-1 葡聚糖可用来检测与多药转运体 (transporter) 活性有关的胞质液碱化作用, 并可研究 connexin 43 通道的 pH 调节。SNARF 葡聚糖交联物可通过刮除负载 (scrape-loaded) 技术进入 MDF-7/ADR 细胞的胞质液。已经发现分子量为 70 000 道尔顿的 SNARF 葡聚糖交联物专一停留在胞质液, 而分子量为 10 000 道尔顿的 SNARF 葡聚糖交联物可测定胞质液和核区的 pH。

HPTS 葡聚糖 (D-7179) 的吸收和发射光谱相对于游离 HPTS 向长波长区移位约 20 nm, 由于光谱形状的改变, 在水性溶液中酸形式的最大吸收波长 (约 375 nm) 事实上比游离染料的波长短 (约 403 nm)。HPTS 葡聚糖保留母体荧光团的比率测量能力, pKa 几乎恰好为 7.0。

2. 测定酸性 pH 的探针葡聚糖 荧光黄、BCECF、HPTS、SNARF 葡聚糖都可测量 pH 为 6~8 左右的 pH 值, 对于测定酸性细胞器的摄取也是有用的, 如在入胞作用时, 这些探针葡聚糖可进入中等酸性的细胞器 (pH<5.5) 后可发生: ①荧光黄、BCECF、HPTS 葡聚糖的荧光可强烈淬灭; ②双标记荧光黄-四甲基罗丹明葡聚糖 (D-1950、D-1951) 520/570 nm 发射强度比率降低; ③SNARF-1 葡聚糖 580/640nm 发射比率增加。

上面讨论的探针葡聚糖是检测易位到具有酸性 pH 细胞器的有用探针, 但是, 在 pH 低于 6 左右时, 它们荧光的相对不敏感性限制了对 pH 定量的估计。俄勒冈绿 488 和俄勒冈绿 514 葡聚糖交联物具有较低的 pKa 值, 因此更适合评价相对酸性溶酶体环境的 pH, 而且, 在酸性介质中, 它们激发光谱的移位使得它们可进行比率 pH 测量。

LysoSensor Yellow/Blue 染料分子量 10 000 道尔顿的葡聚糖交联物 (L-22460) 可用来快速和准确地测定溶酶体的 pH。当这种标记葡聚糖被细胞摄取后, 可通过内吞途径运动, LysoSensor 染料的荧光从近中性内体的蓝色荧光变为酸性溶酶体的长波长黄色荧光。荧光发射的最大变化发生在接近染料 pKa 的 pH 值, 约为 pH 4.2。通过使用 LysoSensor Yellow/Blue 葡聚糖, 溶酶体 pH 可用荧光显微镜或流式细胞仪测量。

(二) 亲脂性 pH 探针

1. 亲脂性荧光黄 临近膜表面的 pH 测定, 常因为存在静电电荷和溶剂化作用对表面结合探针 pKa 存在影响, 因此较为复杂。膜嵌人性荧光黄 DHPE (F-362) 的 pKa 约为 6.2, 相当接近游离荧光黄的 pKa。研究人员使用荧光黄 DHPE pH 依赖的荧光测量了沿脂质单层的侧向的质子传导, 这种荧光黄标记的磷脂也可用来追踪磷脂囊泡中来自内部隔室 (细胞器) 的质子易位。对于更酸性的环境, 可使用俄勒冈绿 488 DHPE (O-12650)。其他相关的亲脂性荧光黄衍生物, 包括 5-十二烷酰氨基荧光黄 (5-dodecanoylamino fluorescein, D-109)、5-十六烷酰氨基荧光黄 (5-hexadecanoylamino fluorescein, H-110)、5-十八烷酰氨基荧光黄 (5-octadecanoylamino fluorescein, O-322)。F-362 即 N-(fluorescein-5-thiocarbamoyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (fluorescein DHPE), 分子式为 $\text{C}_{64}\text{H}_{100}\text{N}_3\text{O}_{13}\text{PS}$, 分子量为 1 182.54 道尔顿, CAS 编号/名称为 87706-98-7; O-12650 即 Oregon Green 488 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (Oregon Green 488 DHPE), 分子式为 $\text{C}_{58}\text{H}_{82}\text{F}_2\text{NO}_{14}\text{P}$, 分子量为 1086.25 道尔顿; D-109 即 5-dodecanoylamino fluorescein, 分子式为 $\text{C}_{32}\text{H}_{35}\text{NO}_6$, 分子量为 529.63 道尔顿, CAS 编号/名称为 107827-77-0; H-110 即 5-hexadecanoylamino fluorescein, 分子式 $\text{C}_{36}\text{H}_{43}\text{NO}_6$, 分子量为 585.74 道尔顿, CAS 编号/名称为 73024-80-3; O-322 即 5-octadecanoylamino fluorescein, 分子式为 $\text{C}_{38}\text{H}_{47}\text{NO}_6$, 分子量为 613.79 道尔顿, CAS 编号/名称为 110698-53-8。

2. 亲脂性的香豆素 4-十七烷基-7-羟香豆素 (4-Heptadecyl-7-hydroxycoumarin, H-22730) 是一种 pH 敏感性的蓝色荧光 7-羟香豆素 (伞形酮) 荧光团的烷基衍生物。与亲脂性的香豆素一样, 4-十七烷基-7-羟香豆素主要用作膜表面的探针。7-羟基的去质子化强烈依赖于膜表面静电位。4-十七烷基-7-羟香豆素 pKa 在阳离子去垢剂 CTAB 中为 6.35, 而在阴离子去垢剂十二 (烷) 基硫酸钠 (SDS) 中为 11.15, 可通过它的荧光反应测量。亲脂性的 pH 探针的 pKa 值强烈依赖于膜表面的离子构成, 是膜表面静电位的敏感探针。4-十七烷基-7-羟香豆素可测定分离的正常和具有多药抗性的鼠白血病细胞的质膜膜界面上 pH 的不同, 还可用来研究阳离子脂类和 DNA 的相互作用。H-22730 即 4-heptadecyl-7-hydroxycoumarin, 分子式为 $C_{26}H_{40}O_3$, 分子量为 400.60 道尔顿, CAS 编号 26038-83-5。

(三) 用于制备 pH 敏感性交联物的反应性染料

以上讨论的许多 pH 探针可与生物分子形成交联物产生 pH 敏感的示踪剂, 制备的交联物可用来追踪吞饮作用、吞噬作用、细胞器运输和其他过程, 如荧光黄标记的转铁蛋白 (T-2871) 具有 pH 敏感性, 常用来检测与这种铁转运糖蛋白内吞处理有关的 pH 变化。对于这类应用, 荧光黄交联物并不表示是最好的, 因为它们在 pH 5.5 以下的范围敏感性很差。使用俄勒冈绿 488 染料交联物 (包括俄勒冈绿 488 转铁蛋白, T-13341) 可使反应范围得到扩展, 它们比荧光黄具有更低的 pKa (其 pKa 为 4.7, 而荧光黄 pKa 为 6.4), 但它们的光谱基本相同。Elizabeth Simons 等用 FITC 标记真菌 (F-143、F-1906、F-1907) 和俄勒冈绿 488 异硫氰酸盐 (O-6080), 研究了吞噬体 pH 对人单核巨噬细胞杀菌和抑菌活性的影响。活的或加热杀死的真菌的吞噬作用可引起 pH 水平升高 (pH 4.7~5.7), 498/450 nm 荧光激发比率作为 pH 的函数绘制的标准曲线 (图 23-19) 说明俄勒冈绿 488 交联物敏感性更强。

Vergne 等使用酵母聚糖 (热杀死酵母) 用俄勒冈绿 488 羧酸琥珀酰亚胺基酯 (O-6147) 和羧四甲基罗丹明 (carboxytetramethylrhodamine, C-1171) 双标记测量 J664 巨噬细胞吞噬体 pH, 使用双发射

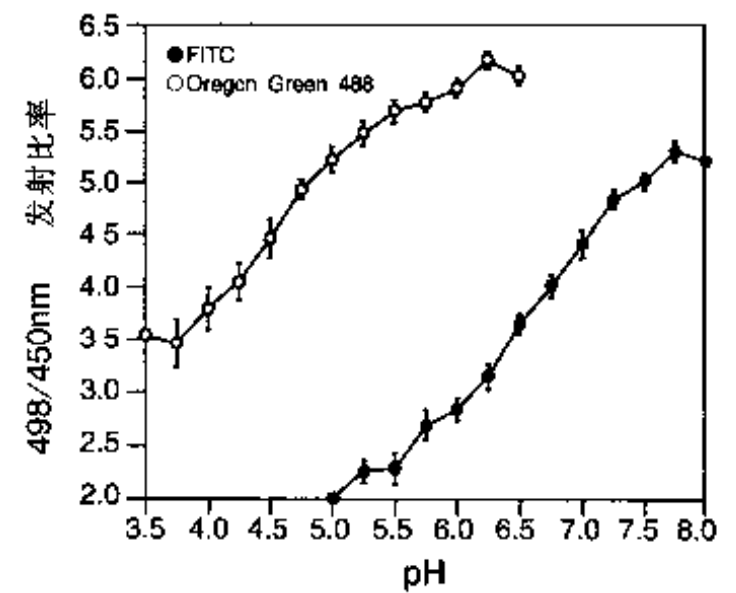


图 23-19 使用俄勒冈绿 488 异硫氰酸盐 (O-6080) 或 FITC (F-143、F-1906、F-1907) 标记的真菌 *Cryptococcus neoformans*, 测定吞噬体内 pH 的校准曲线。吞噬了 *C. neoformans* 的人单核细胞起源的巨噬细胞暴露在控制 pH 的缓冲液中, 其中含有 K^+/H^+ 离子载体尼日利亚菌素 (N-1495), 对应于不同 pH 水平的 498/450 nm 荧光激发比率用分光荧光计测定 (数据由波士顿大学 Elizabeth Simons 博士提供)

表 23-26 胺反应性 pH 探针染料

pH 探针	首选的胺反应性形式
BCECF	BCECF (B-1151) *
Carboxyfluorescein	5- (and-6) -carboxyfluorescein, succinimidyl ester (C-1311)
6-HEX	6-carboxy-2',4,4',5',7,7'-hexachlorofluorescein, succinimidyl ester (C-20091)
6-JOE	6-carboxy-4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxyfluorescein, succinimidyl ester (C-6171)
Naphthofluorescein	5- (and-6) -carboxynaphthofluorescein, succinimidyl ester (C-653)
Oregon Green 488	Oregon Green 488 carboxylic acid, succinimidyl ester (O-6147, O-6149)
Oregon Green 514	Oregon Green 514 carboxylic acid, succinimidyl ester (O-6139)
SNAFL-1	5- (and-6) -carboxy SNAFL-1, succinimidyl ester (C-3061)
SNARF-1	SNARF-1 carboxylic acid, acetate, succinimidyl ester (S-22801); 5- (and-6) -carboxy SNARF-1 (C-1270) *
6-TET	6-carboxy-2',4,7,7'-tetrachlorofluorescein, succinimidyl ester (C-20092)

* 在与胺反应前羧酸需要用 EDAC/NHSS 活化。

(530/585 nm) 流式细胞分析, 可估计的 pH 值可低至 4.0。

制备有用交联物最常用的方法是用胺与琥珀酰亚胺基酯或 pH 探针的异硫氰酸盐反应。包括羧基 SNARF-1、羧基 SNAFL-1、羧基萘荧光黄染料的琥珀酰亚胺基酯 (S-22801、C-3061、C-653)。氯化荧光黄衍生物 6-JOE (pKa 约 11.5, C-6171)、6-TET (pKa 约 4.5, C-20092)、6-HEX (pKa 约 3, C-20091) 的琥珀酰亚胺基酯可用来制备可对强酸性 (6-HEX) 或强碱性 (6-JOE) pH 水平起反应的交联物。当不能得到胺反应性 pH 探针时, 经常在原位制备磺基琥珀酰亚胺基酯, 将羧酸染料溶解在含有 N-羟基琥珀酰亚胺和 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基) 碳化二亚胺 (NHSS, H-2249; EDAC, E-2247) 的缓冲液中即可, 将 NHSS 加入缓冲液使 carbodiimide 介导的交联作用增强。使用 EDAC/NHSS 可制备出合适的胺反应性 pH 探针 (表 23-26)。

第五节 细胞骨架蛋白荧光探针

最初认为活细胞质是由无色透明、均匀的胶体物质组成, 可以随着环境条件的变化而改变形状。随着科学的发展, 发现细胞质中除了可溶性细胞溶胶以外, 还存在有蛋白质组成的细丝结构, 这些细丝结构具有一定的形态、化学组成和功能。真核细胞具有一定的形状, 而且能改变形状, 能从一个地方迁移到另一个地方, 重新安排细胞内部结构, 这和分布在整个胞质内蛋白细丝组成的复杂网络有关, 这种复杂网络就是细胞骨架, 为真核细胞中的蛋白纤维网架体系, 是细胞的重要组成成分, 属非膜相的细胞器, 包括: 微丝 (microfilament)、微管 (microtubule)、中间丝 (intermediate filament) 和微梁网络。

免疫荧光技术对细胞骨架研究起着推动作用。用生化方法分别提纯细胞骨架的蛋白质, 如微管主要成分微管蛋白、微丝的肌动蛋白、中间纤维的多种蛋白成分等, 将这些蛋白提纯分别注射到实验动物, 产生抗体, 用荧光素标记抗体和细胞作用后, 在荧光显微镜下显示不同蛋白细丝在细胞内分布。另外, 在荧光探针中的罗丹明-鬼笔环肽, 可以专一地标记肌动蛋白微丝, 可以在荧光镜下观察微丝的分布。采用免疫电镜技术, 用胶体标记单克隆抗体, 使各种骨架蛋白纤维丝在细胞内可精确地定位、定性和定量分析。在真核细胞核中发现核骨架-核纤层体系, 核骨架、核纤层与中间纤维在结构上相互连接形成贯穿在细胞核和细胞质之间的统一网络体系。

由于细胞骨架是细胞结构的基本成分, 这些骨架能影响细胞的大小、形状、移动性、分裂和包括吸收及分泌的运送过程, 而且也是最容易用荧光试剂标记的成分之一, 应用荧光探针研究细胞骨架具有广阔的前景。本部分主要介绍标记单体肌动蛋白 (G-actin)、纤维状肌动蛋白 (F-actin) 及微管蛋白、微管蛋白交联物、进行微管蛋白染色的试剂和其他细胞骨架蛋白的荧光探针。

一、肌动蛋白荧光探针

(一) 未标记和荧光肌动蛋白

荧光素标记的肌动蛋白是体内研究细胞骨架动力学的重要工具, 分子探针公司可提供从兔平滑肌提取的高度纯化的肌动蛋白 (彩图 20, 彩图 21), 同时还有相应的荧光交联物。绿色荧光的 Alexa Fluor 488 肌动蛋白交联物 (A-12373) 的最大激发和发射波长与荧光黄标记的肌动蛋白相似 (图 23-20), 但比荧光黄的荧光强度更强、光稳定性更好、光谱对 pH 依赖性更小。橘红色荧光的 Alexa Fluor 568 肌动蛋白交联物 (A-12374) 的荧光强度比光谱性质相似的 Lissamine 罗丹明 B 交联物更强。

荧光肌动蛋白交联物可使用 Kellogg DR 等人描述的方法制备。标记后, 交联物经解聚和再聚合处理, 确保肌动蛋白交联物能适当装配, 标记的肌动蛋白聚合物可通过离心与未标记的肌动蛋白单体分离。

(二) F-肌动蛋白荧光探针

目前发现, 包括次毒蕈环肽 (phalloidin)、phalloidin 及其生物素化衍生物毒蕈肽 (Phallotoxins) 可选择性标记 F-肌动蛋白。毒蕈肽是从死的伞形毒菌 *Amanita phalloides mushroom* 分离出来的一种环肽。

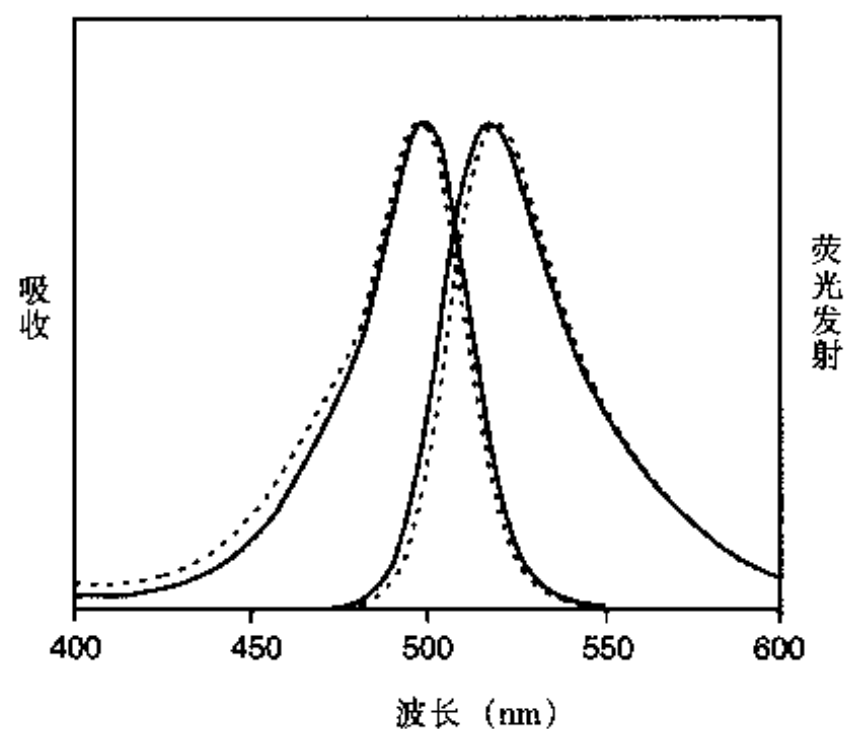


图 23-20 山羊抗小鼠 IgG 抗体 [F-2761, 虚线] 和 Alexa Fluor 488 山羊抗小鼠 IgG 抗体 [A-11001, 实线] 的吸收和荧光发射波长。Alexa Fluor 488 交联物的荧光强度显然比荧光黄交联物强。数据经标准化以显示光谱的相似性

用于检测细胞膜的完整性是否受到损害。但是, 也有报道指出未标记的鬼笔环肽, 可穿透某些缺氧细胞的细胞膜。Small 等采用不同的荧光探针, 对固定细胞和活细胞的肌动蛋白细胞骨架进行了广泛的研究。标记的毒蕈肽对粗丝和细丝有相似的亲和性, 在肌细胞和非肌细胞, 每个毒蕈肽可结合一个肌动蛋白亚

表 23-27 列出了可得到的毒蕈肽衍生物, 及它们的光谱性质和与 F-肌动蛋白结合的某些衍生物的结合常数。详细的染色步骤在以下内容中叙述。

每瓶荧光毒蕈肽可染色 300 张左右的切片, 每瓶生物素化-XX 鬼笔环肽可供 50 张左右的切片应用。另外, 可用未标记的鬼笔环肽 (P-3457) 阻断标记的毒蕈肽对 F-肌动蛋白的染色, 并可促进肌动蛋白的聚合。

1. 毒蕈肽衍生物的性质 荧光性和生物素化的毒蕈肽衍生物在 nmol/L 浓度下即可选择性标记 F-肌动蛋白, 而且易溶于水, 因此提供了一种方便地鉴定和定量组织切片、细胞培养物或游离细胞样品肌动蛋白的方法。使用含有荧光性毒蕈肽 (如 BODIPY FL phalloidin, B-607) 的阳离子脂质体, 可有效标记活神经元的 F-肌动蛋白。这一过程使得细胞培养物在受到最小程度破坏的情况下得到完整的标记, 因为荧光性鬼笔环肽交联物不能穿透大多数活细胞, 因此可

表 23-27 F 肌动蛋白选择性探针的光谱特征 (分子探针公司)

产品编号	肌动蛋白选择性探针	激发/发射波长 *	近似分子量
A-22281	Alexa Fluor 350 phalloidin	346/442	1100
C-606	Coumarin phalloidin	355/443	1100
N-354	NBD phalloidin	465/536	1040
A-12379	Alexa Fluor 488 phalloidin	495/518	1320
F-432	Fluorescein phalloidin	496/516+	1175
O-7466	Oregon Green 488 phalloidin	496/520+	1180
B-607	BODIPY FL phalloidin	505/512	1125
O-7465	Oregon Green 514 phalloidin	511/528+	1281
E-7463	Eosin phalloidin	524/544	1500
A-22282	Alexa Fluor 532 phalloidin	531/554	1350
R-415	Rhodamine phalloidin	554/573+	1250
A-22283	Alexa Fluor 546 phalloidin	556/573	1800
B-3475	BODIPY 558/568 phalloidin	558/569	1115
A-12380	Alexa Fluor 568 phalloidin	578/600	1590
A-12381	Alexa Fluor 594 phalloidin	580/609	1620
B-7464	BODIPY TR-X phalloidin	589/617	1400
T-7471	Texas Red-X phalloidin	591/608+	1490
A-22284	Alexa Fluor 633 phalloidin	632/647	1900
A-22287	Alexa Fluor 647 phalloidin	650/668	1950
B-12382	BODIPY 650/665 phalloidin	647/661	1200
A-22285	Alexa Fluor 660 phalloidin	663/690	1750
A-22286	Alexa Fluor 680 phalloidin	679/702	1850
B-7474	Biotin-XX phalloidin	不可用	1300
P-3457	Phalloidin	不可用	790

* 最大激发和发射波长 (nm)。毒蕈肽光谱是在水性缓冲液 pH 为 7~9 (+) 或甲醇中测得的。

基,与某些肌动蛋白抗体不同,毒蕈肽不与 G-肌动蛋白单体结合。与用于肌动蛋白标记的抗体相比,毒蕈肽还具有以下优点:①与肌动蛋白结合的特性不随物种的种属特性发生改变,包括动物和植物;②非特异性染色可以忽略不计,因此染色区和未染色区对比鲜明;③毒蕈肽可使肌动蛋白单体/聚合体的均势向聚合体倾斜,使聚合的临界浓度降低达 30 倍,而且,使 F-肌动蛋白更为稳定;④毒蕈肽的结合可抑制细胞松弛素、碘化钾、高温下对 F-肌动蛋白的解聚作用;⑤F-肌动蛋白的解聚作用。因为毒蕈肽衍生物相当小,直径大约为 12~15Å,分子量在 2 000 道尔顿以下,因此许多肌动蛋白结合蛋白——包括肌球蛋白 (myosin)、原肌球蛋白 (tropomyosin)、肌钙蛋白 (troponin) 和 DNase I,在用荧光性毒蕈肽处理后仍能 and 肌动蛋白结合。而且在与肌动蛋白结合后,不影响肌动蛋白的功能:毒蕈肽标记的肌动蛋白丝仍保持某些功能特点,标记的甘油化的肌纤维仍可收缩,标记的肌动蛋白丝仍可在固相肌浆球蛋白底物上移动。

2. Alexa Fluor 鬼笔环肽 Alexa Fluor 染料有出色的性质,几乎可获得全部光谱范围的 Alexa Fluor 标记的鬼笔环肽。Alexa Fluor 鬼笔环肽交联物在荧光强度和光稳定性方面比检测的任何相似光谱的交联物都优越。

在固定和可穿透性细胞,采用这些荧光性鬼笔环肽进行 F-肌动蛋白标记可获得良好结果。可在以下网址中观察 Alexa Fluor 488 鬼笔环肽标记的肌动蛋白视频图像,Journal of Cell Biology 网址如下:(<http://www.jcb.org/cgi/content/full/150/2/361/DC1>)。

3. 俄勒冈绿 (Oregon Green) 鬼笔环肽 对于固定和穿透细胞,进行 F-肌动蛋白标记时常喜欢使用绿色荧光。但令人遗憾的是,绿色荧光黄鬼笔环肽和 NBD 鬼笔环肽光漂白迅速,使图像采集和摄影十分困难。但俄勒冈绿 488 鬼笔环肽 (O-7466) 和波长稍长的俄勒冈绿 514 鬼笔环肽 (O-7465) 都是很好的绿色荧光探针,都可用标准的荧光黄滤片组进行观察。

俄勒冈绿 514 鬼笔环肽的光稳定性比荧光黄鬼笔环肽好 (图 23-21),因此更容易观察和摄影。

4. BODIPY 毒蕈肽 BODIPY 毒蕈肽交联物 (B-607、B-3475、B-7464、B-12382) 与传统的 NBD、荧光黄和罗丹明毒蕈肽交联物相比有一些重要的优点。BODIPY FL、BODIPY 558/568 和 BODIPY TR-X 荧光团的激发和发射波长分别与荧光黄、罗丹明 B 和 Texas Red 染料的激发和发射波长相似,可用标准滤片组观察 (彩图 22)。

BODIPY 650/665 次毒蕈环肽 (B-12382) 是一种可得到的最长波长的 BODIPY phalloxin 交联物,用于多色荧光标记实验较为合适。BODIPY 650/665 次毒蕈环肽、Alexa Fluor 647 次毒蕈环肽 (A-22287) 和 Alexa Fluor 660 次毒蕈环肽 (A-22285) 是为数不多的几种可被多数激光扫描共聚焦显微镜 647nm Ar-Kr 激光激发的荧光素。

5. 毒蕈肽交联物的切片染色步骤 以下叙述的是 NBD phalloidin 的染色步骤 (Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 980),对于其他毒蕈肽交联物同样适用,该染色程序可能对于一个特定实验体系并不是最好的,但在多数情况下都可获得满意结果。生长在盖玻片上的贴壁细胞的染色步骤如下:

(1) 甲醛固定细胞

①细胞用预温的 PBS (pH 7.4) 洗 2 次;

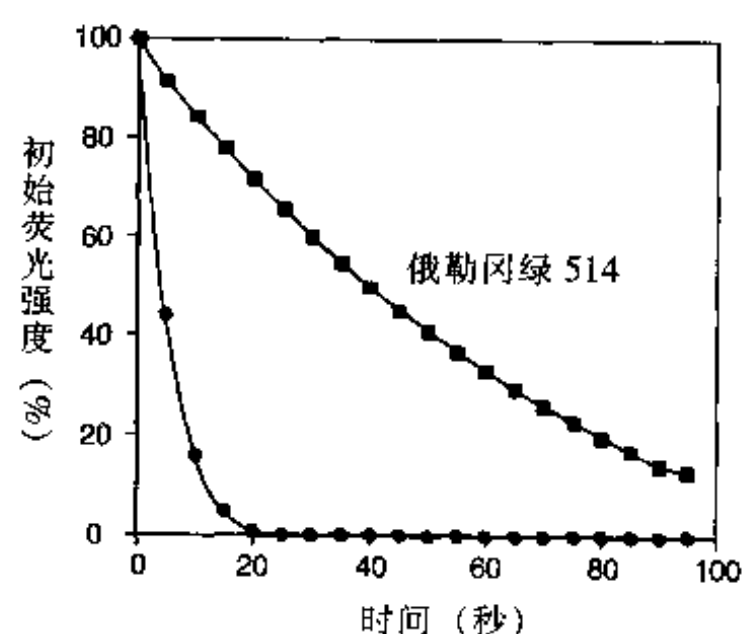


图 23-21 俄勒冈绿 514 鬼笔环肽 (O-7465) 和荧光黄鬼笔环肽 (F-432) 光稳定性比较。CRE BAG 2 成纤维细胞用甲醛固定、丙酮穿透,而后进行荧光鬼笔环肽染色。样品同时照明,每 5 s 用 Star 1 CCD 摄像机 (Photometrics) 采集一幅图像;视野中的平均荧光强度用 Image-1 软件 (Universal Imaging Corp.) 进行计算,表示为初始荧光强度的百分比。采集代表不同视野的三组荧光强度数据被每种标记的鬼笔环肽平均后绘出随时间变化的曲线

②用 PBS 配制的 3.7% 甲醛室温固定细胞 10 min;

③PBS 洗 2~3 次,

④每一玻璃培养皿中放置一张盖玻片, 用 -20°C 丙酮或 0.1% Triton X-100 (PBS 配制) 粹取 (浸泡) 3~5min,

⑤PBS 洗 2~3 次。

⑥用荧光毒蕈肽探针染色, 将 $5\mu\text{l}$ 甲醇储存液用 PBS 稀释到 $200\mu\text{l}$, 染色液中加入 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 以降低非特异性背景染色。在加入毒蕈肽染色液之前, 先用含有 1% BSA 的 PBS 孵育细胞 20~30min 也有同样效果。当用生物素-XX 次毒蕈环肽 (B-7474) 染色时, 将 $10\mu\text{l}$ 甲醇储存液用 PBS 稀释到 $200\mu\text{l}$, 根据需要调整染液浓度和用量, 以获得适当的染色强度;

⑦室温下染色 20min (一般情况下, 温度在 4°C ~ 37°C 之间都可以)。将切片放在湿盒中染色, 防止染色液蒸发;

⑧PBS 洗 2~3 次;

⑨当使用生物素-XX 次毒蕈环肽时, 用 $10\mu\text{g/ml}$ 的荧光素或酶交联的链亲和素 (streptavidin) $100\mu\text{l}$ 室温孵育 30 min (亲和素交联物用 100mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; 150mmol/L NaCl; 0.3% Triton X-100 和 1% BSA 溶解), 孵育后用 PBS 洗涤玻片。以适当显色方法显色;

⑩用 1:1 PBS-甘油溶液封片。

用这种方法染色的切片, 肌动蛋白的染色在 4°C 暗处可保存 2~3 d。如细胞经空气干燥, 丙烯酸树脂如 Cytoseal 封片, 在 4°C 暗处肌动蛋白的染色则可保存半年之久。

(2) 同时进行固定、穿透和荧光毒蕈肽染色的方法 毒蕈肽用 4% 甲醛缓冲液固定在短期内保持稳定, 因此可进一步固定、穿透和标记过程。

①制备 1 ml 含有 50~100 $\mu\text{g/ml}$ lysopalmitoylphosphatidylcholine 和 3.7% 甲醛的溶液, 而后加入 5~10 单位荧光毒蕈肽 (大约为 25~50 μl 甲醛储存液);

②将染色液加到细胞上, 4°C 孵育 20 min;

③迅速用缓冲液洗 3 次;

④封片、观察。

(3) 活细胞 毒蕈肽通常不能透过细胞膜, 因此在活细胞应用不多, 但已经发现活细胞可被毒蕈肽标记, 胞饮作用可能是毒蕈肽进入某些细胞的方法。通常染活细胞需要大量的染料, 罗丹明次毒蕈环肽可以显微注射方式注射入成纤维细胞而基本不引起细胞形态的改变, 次毒蕈环肽注射后可改变活细胞肌动蛋白的分布并影响细胞的运动。

(4) 荧光显微镜检查 进行荧光测量时主要关心的问题之一是光稳定性或对光漂白的抵抗作用。Alexa Fluor、俄勒冈绿、BODIPY、罗丹明荧光团 (包括 Texas Red-X) 光稳定性比 NBD 和荧光黄要好, 更适合进行更精确的照相测定。为进一步降低光漂白作用, 应减少荧光标记标本的光照时间, 应用中密度滤光片, 注意仅在需要观察标本或记录信号的时候才将标本进行照射。使用高数值孔径的物镜、相对较低的放大倍数、高质量的光学滤片、高速胶卷或高效检测器进行图像采集, 以获得最大的荧光强度。抗衰减试剂, 包括 SlowFade、SlowFade Light and ProLong 抗衰减试剂盒 (S-2828、S-7461、P-7481), 可使许多荧光探针的有效寿命得到延长 (Science 1982; 217:1252)。这些抗衰减溶剂可在固定的标本使用, 而对于活细胞标本则不合适。细胞封片剂 Cytoseal 也可保护 BODIPY 荧光团的光漂白作用。

此外, BODIPY 染料比这些传统的荧光团光稳定性更好、发射带宽更窄, 因此更适合进行荧光双标记和荧光三标记实验。

BODIPY FL phalloidin (B-607), 荧光信号比荧光黄次毒蕈环肽要好, 因此被用来定量 F-肌动蛋白并确定它在细胞内的分布。

6. 罗丹明次毒蕈环肽和其他红色荧光次毒蕈环肽 罗丹明次毒蕈环肽 (R-415) 是红色荧光毒蕈肽

的典范,是一种广泛采用的荧光探针,罗丹明次毒蕈环肽可被大多数荧光显微镜的水银弧光灯有效激发。

但是,在多色荧光标记实验中常用 Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Texas Red-X 标记的次毒蕈环肽(A-22283、A-12380、A-12381、T-7471)替代罗丹明次毒蕈环肽,因为它们的发射光谱可更好地与绿色荧光探针 Alexa Fluor 488、俄勒冈绿和荧光黄进行区分。此外, Alexa Fluor 568 和 Texas Red-X 交联物可被多种共聚焦显微镜使用的氩-氦激光的 568nm 谱线激发,而用于制备罗丹明次毒蕈环肽的四甲基罗丹明荧光团则很难被该激光激发。

7. 其他荧光团标记的毒蕈肽,包括伊红次毒蕈环肽 尽管光稳定性不是很好,但黄绿色荧光的 NBD phalloidin (N-354) 和绿色荧光的荧光黄次毒蕈环肽 (F-432) 仍在使用。

通过使用 Prolong 抗衰减剂 (P-7481) 封片,荧光黄次毒蕈环肽和其他一些荧光毒蕈肽的光稳定性得到相当大的改善。采用 Alexa Fluor 488、俄勒冈绿 488、俄勒冈绿 514 和 BODIPY FL 毒蕈肽作为肌动蛋白标记的绿色荧光探针较理想。Alexa Fluor 350 次毒蕈环肽 (phalloidin, A-22281) 和香豆素 phalloidin (C-606) 标记肌动蛋白的蓝色荧光毒蕈肽交联物,同时进行荧光和电镜研究时,可采用伊红次毒蕈环肽 (E-7463)。

Capani F 等报道了用四氧化钨处理后, DAB 的伊红介导的光氧化作用,可产生一种不溶性的、高电子密度的 DAB 氧化产物,在光镜和电镜下都能观察到,因此可进行电镜水平的三维重建。采用光镜和电镜技术,生物素-XX 次毒蕈环肽 (B-7474) 也可用来检测 F-肌动蛋白。

这种生物素交联物可用荧光团标记或酶标记的卵白素 (avidin) 和链亲和素进行显现,也可结合应用酪胺酰胺 (tyramide) 信号扩增技术 (tyramide signal amplification, TSA)、新的 ELF 信号扩增技术、NANOGOLD 或 Alexa Fluor FluoroNanogold 链亲和素。生物素-XX 次毒蕈环肽与链亲和素或 Captavidin 琼脂糖 (S-951, C-21386) 结合应用,可用来从克隆刺激因子 1 刺激的巨噬细胞胞质液的抗磷脂酰酪氨酸反应片段中沉淀 F-肌动蛋白。

(三) DNase I 交联物 G-肌动蛋白荧光探针

牛胰腺脱氧核糖核酸酶 (DNase I, 分子量约 31 000 道尔顿) 与 G-肌动蛋白单体结合,亲和指数约为 5×10^{-8} mol/L。与未标记的 DNase I 相似,荧光 DNase I 交联物 (见表 23-28) 可选择性标记 G-肌动蛋白,可用来检测和定量细胞中未聚合的肌动蛋白。

表 23-28 G-肌动蛋白选择性探针的光谱特点

产品编号	肌动蛋白选择性探针	激发/发射波长 (nm) *
D-970	DNase I, 荧光黄交联物	494/517
D-12371	DNase I, Alexa Fluor 488 交联物	495/519
D-7497	DNase I, Oregon Green 488 交联物	496/516
D-12372	DNase I, Alexa Fluor 594 交联物	590/617
D-972	DNase I, Texas Red 交联物	597/618

* 最大激发/发射波长。DNase I 交联物的光谱是指在 pH 为 7~8 水性缓冲液中的光谱。

用荧光黄 DNase I、BODIPY 581/591 次毒蕈环肽和抗肌动蛋白的单克隆抗体 (二抗用小瀑布蓝标记) 可对内皮细胞进行荧光三标记。表 23-29~表 23-35 列出了分子探针公司的二抗交联物。单克隆抗体既可与 G-肌动蛋白结合,也可与 F-肌动蛋白结合,而且与 DNase I 和次毒蕈环肽交联物共存,提示这三种探针可与肌动蛋白分子的独特位点结合。

研究人员可根据自己的实际需要和检测仪器,在多标记荧光实验中,选择荧光黄 (D-970)、Alexa Fluor 488 (D-12371)、Oregon Green 488 (D-7497)、Alexa Fluor 594 (D-12372) 或 Texas Red (D-972) DNase I 交联物 (见表 23-36)。

荧光黄 DNase I、Alexa Fluor 488 和 Alexa Fluor 594 DNase I 交联物可与荧光标记的毒蕈肽联合应用,同时显示 G-肌动蛋白聚集物和丝状 F-肌动蛋白,也可用来研究活的非肌细胞中微丝的破坏。罗丹明次毒蕈环肽(R-415)与俄勒冈绿 488 标记的 DNAse I 联合应用,采用激光扫描共聚焦显微镜可确定 *Dictyostelium* F-肌动蛋白和 G-肌动蛋白的比率。采用 Texas Red DNase I 和俄勒冈绿 488 次毒蕈环肽(O-7466)可在小鼠的成纤维细胞胞质和细胞周边观察到 G-肌动蛋白和 F-肌动蛋白的复杂网络。细胞松弛素对单核细胞肌动蛋白结构的影响,可通过使用 Texas Red DNase I 和 BODIPY FL phalloidin (B-607) 分别染色 G-肌动蛋白和 F-肌动蛋白,采用流式细胞术可进行定量。荧光 DNase I 可作为一种模拟系统用来研究核苷酸、阳离子和细胞松弛素 D 与单体肌动蛋白的相互作用。

表 23-29 与小鼠 IgG 重链和轻链结合的亲和纯化的抗小鼠 IgG 交联物

产品编号	标记物	发射颜色	吸收波长 (nm) *	发射波长 (nm) *
山羊抗小鼠 IgG, 全抗体, 用抗人 IgG 和血清交叉吸收				
A-11045	Alexa Fluor 350	蓝色	346	442
M-10991	Marina Blue	蓝色	365	460
C-962	Cascade Blue	蓝色	400	420
P-10993	Pacific Blue	蓝色	410	455
A-11063	Alexa Fluor 430	黄绿色	434	539
F-2761	Fluorescein	绿色	494	518
A-11001	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
O-6380	Oregon Green 488	绿色	496	524
B-2752	BODIPY FL	绿色	505	513
O-6383	Oregon Green 514	绿色	511	530
A-11002	Alexa Fluor 532	黄色	531	554
T-2762	Tetramethylrhodamine	橙色	555	580
A-11003	Alexa Fluor 546	橙色	556	573
A-21422	Alexa Fluor 555	橙色	555	565
P-852	R-Phycoerythrin (R-PE)	橙色	496, 546, 565	578
R-6393	Rhodamine Red-X	橙红色	570	590
A-11004	Alexa Fluor 568	橙红色	578	603
A-11005	Alexa Fluor 594	红色	590	617
T-862	Texas Red	红色	595	615
T-6390	Texas Red-X	红色	595	615
A-21050	Alexa Fluor 633	红色	632	647
A-20980	Alexa Fluor 610-R-PE	红色	496, 546, 565	630
A-865	Allophycocyanin	远红外	650	660
A-21235	Alexa Fluor 647	远红外	650	668
A-20990	Alexa Fluor 647-R-PE	远红外	496, 546, 565	668
A-21054	Alexa Fluor 660	远红外	663	690
A-21057	Alexa Fluor 680	远红外	679	702
A-20983	Alexa Fluor 680-R-PE	远红外	496, 546, 565	702
A-21000	Alexa Fluor 680-allophycocyanin	远红外	650	702
B-2763	Biotin	NA	<300	NA
D-20690	DSB-X biotin	NA	<300	NA

续表 23-29

续表

产品编号	标记物	发射颜色	吸收波长 (nm) *	发射波长 (nm) *
G-21040	辣根过氧化物酶	不适用	NA	NA
G-21060	碱性磷酸酶	不适用	NA	NA
山羊抗小鼠, 全抗体, 用抗牛、山羊、兔、大鼠、人 IgG 和血清高度交叉吸收				
A-11029	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
O-11033	Oregon Green 488	绿色	496	524
A-11030	Alexa Fluor 546	橙色	556	573
A-21424	Alexa Fluor 555	橙色	555	565
A-11031	Alexa Fluor 568	橙红色	578	603
A-11032	Alexa Fluor 594	红色	590	617
A-21052	Alexa Fluor 633	红色	632	647
A-21236	Alexa Fluor 647	远红外	650	668
A-21055	Alexa Fluor 660	远红外	663	690
A-21058	Alexa Fluor 680	远红外	679	702
D-20691	DSB-X biotin	不适用	<300	NA
山羊抗小鼠 IgG, F(ab') ₂ 片段, 用抗人 IgG 和血清交叉吸收				
A-11068	Alexa Fluor 350	蓝色	346	442
F-11021	Fluorescein	绿色	494	518
A-11017	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
A-11018	Alexa Fluor 546	橙色	556	573
A-21425	Alexa Fluor 555	橙色	555	565
A-11019	Alexa Fluor 568	橙红色	578	603
A-11020	Alexa Fluor 594	红色	590	617
A-21053	Alexa Fluor 633	红色	632	647
A-21056	Alexa Fluor 660	远红外	663	690
A-21059	Alexa Fluor 680	远红外	679	702
B-11027	生物素	不适用	<300	NA
D-20692	DSB-X biotin	不适用	<300	NA
F-21452	碱性磷酸酶	不适用	NA	NA
F-21453	辣根过氧化物酶	不适用	NA	NA
兔抗小鼠 IgG, 全抗体, 用抗人血清交叉吸收				
A-21062	Alexa Fluor 350	蓝色	346	442
A-11059	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
A-11060	Alexa Fluor 546	橙色	556	573
A-21247	Alexa Fluor 555	橙色	555	565
A-11061	Alexa Fluor 568	橙红色	578	603
A-11062	Alexa Fluor 594	红色	590	617
A-21063	Alexa Fluor 633	红色	632	647
A-10930	Allophycocyanin	远红外	650	660
A-21064	Alexa Fluor 660	远红外	663	690
A-21065	Alexa Fluor 680	远红外	679	702
B-21066	生物素	不适用	<300	NA
R-21454	碱性磷酸酶	不适用	NA	NA
R-21455	辣根过氧化物酶	不适用	NA	NA
鸡抗小鼠 IgG				
A-21200	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
A-21201	Alexa Fluor 594	红色	590	617
A-21463	Alexa Fluor 647	远红外	650	668
驴抗小鼠 IgG, 全抗体, 与牛、鸡、山羊、豚鼠、仓鼠 (Hamster)、马、人、兔、大鼠、绵羊血清蛋白交叉反应最小				
A-21202	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
A-21203	Alexa Fluor 594	红色	590	617

* 交联物的最大吸收和荧光发射波长。

表 23-30 与绵羊 IgG 重链和轻链结合的亲和纯化的抗绵羊 IgG 交联物

产品编号	标记物	发射颜色	吸收波长 (nm) *	发射波长 (nm) *
驴抗绵羊 IgG, 全抗体, 用抗小鼠、兔、牛、人血清和 IgG 交叉吸收				
A-21097	Alexa Fluor 350	蓝色	346	442
F-2810	荧光黄	绿色	494	518
A-11015	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
A-21098	Alexa Fluor 546	橙色	556	573
A-21436	Alexa Fluor 555	橙色	565	565
A-21099	Alexa Fluor 568	橙红色	578	603
A-11016	Alexa Fluor 594	红色	590	617
A-21100	Alexa Fluor 633	红色	632	647
A-21448	Alexa Fluor 647	远红外	650	668
A-21101	Alexa Fluor 660	远红外	663	690
A-21102	Alexa Fluor 680	远红外	679	702

* 交联物最大吸收和荧光发射波长。

表 23-31 与山羊 IgG 重链和轻链结合的亲和纯化的抗山羊 IgG 交联物

产品编号	标记物	发射颜色	吸收波长 (nm) *	发射波长 (nm) *
驴抗山羊 IgG, 全抗体, 用抗小鼠、大鼠、兔、人 IgG 交叉吸收				
A-21081	Alexa Fluor 350	蓝色	346	442
A-11055	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
A-11056	Alexa Fluor 546	橙色	556	573
A-21432	Alexa Fluor 555	橙色	555	565
A-11057	Alexa Fluor 568	橙红色	578	603
A-11058	Alexa Fluor 594	红色	590	617
A-21082	Alexa Fluor 633	红色	632	647
A-21447	Alexa Fluor 647	远红外	650	668
A-21083	Alexa Fluor 660	远红外	663	690
A-21084	Alexa Fluor 680	远红外	679	702
兔抗山羊 IgG, 全抗体, 用人和大鼠 IgG 交叉吸收				
A-11078	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
A-21085	Alexa Fluor 546	橙色	556	573
A-21431	Alexa Fluor 555	橙色	555	565
A-11079	Alexa Fluor 568	橙红色	578	603
A-11080	Alexa Fluor 594	红色	590	617
A-21086	Alexa Fluor 633	红色	632	647
A-21446	Alexa Fluor 647	远红外	650	668
A-21073	Alexa Fluor 660	远红外	663	690
A-21088	Alexa Fluor 680	远红外	679	702
R-21458	碱性磷酸酶	不适用	NA	NA
R-21459	辣根过氧化物酶	不适用	NA	NA
鸡抗山羊 IgG				
A-21467	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
A-21468	Alexa Fluor 594	红色	590	617
A-21469	Alexa Fluor 647	远红外	650	668

* 交联物的最大吸收和荧光发射波长。

表 23-32 与鸡 IgG 重链和轻链结合的亲和纯化的抗鸡 IgG 交联物

产品编号	标记物	发射颜色	吸收波长 (nm) *	发射波长 (nm) *
山羊抗鸡 IgG, 全抗体				
A-11039	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
A-11040	Alexa Fluor 546	橙色	556	573
A-21437	Alexa Fluor 555	橙色	555	565
A-11041	Alexa Fluor 568	橙红色	578	603
A-11042	Alexa Fluor 594	红色	590	617
A-21103	Alexa Fluor 633	红色	632	647
A-21449	Alexa Fluor 647	远红外	650	668
A-21104	Alexa Fluor 660	远红外	663	690
D-20701	DSB-X biotin	不适用	<300	NA

* 交联物的最大吸收和荧光发射波长。

表 23-33 与豚鼠 IgG 重链和轻链结合的亲和纯化的抗豚鼠 IgG 交联物

产品编号	标记物	发射颜色	吸收波长 (nm) *	发射波长 (nm) *
山羊抗豚鼠 IgG, 全抗体, 用抗牛、鸡、山羊、仓鼠、人、小鼠、兔、大鼠和绵羊血清交叉吸收				
A-11073	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
A-11074	Alexa Fluor 546	橙色	556	573
A-21435	Alexa Fluor 555	橙色	555	565
A-11075	Alexa Fluor 568	橙红色	578	603
A-11076	Alexa Fluor 594	红色	590	617
A-21105	Alexa Fluor 633	红色	632	647
A-21450	Alexa Fluor 647	远红外	650	668
A-21106	Alexa Fluor 660	远红外	663	690

* 交联物的最大吸收和荧光发射波长。

表 23-34 与 IgM μ 链结合的亲和纯化的山羊抗 IgM* 抗体交联物

荧光团	吸收/发射波长 (nm) **	抗-小鼠	抗大鼠	抗人
Alexa Fluor 488	495/519	A-21042	A-21212	A-21215
Alexa Fluor 546	556/575	A-21045		
Alexa Fluor 555	555/565	A-21426		
Alexa Fluor 568	578/603	A-21043		
Alexa Fluor 594	590/617	A-21044	A-21213	A-21216
Alexa Fluor 633	632/647	A-21046		
Alexa Fluor 647	650/668	A-21238	A-21248	A-21249
Alexa Fluor 660	663/690	A-21047		
Alexa Fluor 680	679/702	A-21048		
DSB-X biotin	不适用	D-20693		

* 也可与其他种属的 IgM 反应, ** 交联物的最大吸收和荧光发射波长。

表 23-35 其他亲和纯化的抗 IgG 抗体的选择

产品编号	标记物	发射颜色	吸收波长 (nm) *	发射波长 (nm) *
山羊抗仓鼠 IgG, 全抗体, 用抗小鼠和大鼠 IgG 交叉吸收				
A-21110	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
A-21111	Alexa Fluor 546	橙色	556	575
A-21112	Alexa Fluor 568	橙红色	578	603
A-21113	Alexa Fluor 594	红色	590	617
A-21114	Alexa Fluor 633	红色	632	647
A-21451	Alexa Fluor 647	远红外	650	668

续表 23-35

产品编号	标记物	发射颜色	吸收波长 (nm) *	发射波长 (nm) *
山羊抗牛 IgG, 全抗体, 用抗小鼠和人 IgG 交叉吸收				
A-21224	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
A-21225	Alexa Fluor 594	红色	590	617
山羊抗马 IgG, 全抗体, 用抗小鼠和人 IgG 交叉吸收				
A-21230	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
A-21231	Alexa Fluor 594	红色	590	617
山羊抗猫 IgG, 全抗体, 用抗小鼠和人 IgG 交叉吸收				
A-21226	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
A-21227	Alexa Fluor 594	红色	590	617
山羊抗狗 IgG, 全抗体, 用抗小鼠和人 IgG 交叉吸收				
A-21228	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
A-21229	Alexa Fluor 594	红色	590	617
山羊抗猪 IgG, 全抗体, 用抗小鼠和人 IgG 交叉吸收				
A-21232	Alexa Fluor 488	绿色	495	519
A-21233	Alexa Fluor 594	红色	590	617

* 交联物的最大吸收和荧光发射波长。

表 23-36 G-肌动蛋白选择性探针的光谱特征

产品编号	肌动蛋白选择性探针	激发/发射波长 (nm) *
D-970	DNase I, 荧光黄交联物	494/517
D-12371	DNase I, Alexa Fluor 488 交联物	495/519
D-7497	DNase I, Oregon Green 488 交联物	496/516
D-12372	DNase I, Alexa Fluor 594 交联物	590/617
D-972	DNase I, Texas Red 交联物	597/618

* 最大激发/发射波长, DNase I 交联物的光谱是指在 pH 为 7~8 的水性缓冲液中测定的结果。

(四) 进行肌动蛋白定量和聚合的探针和方法

1. 定量 F-肌动蛋白和 G-肌动蛋白聚合的方法 用荧光黄次毒蕈环肽、罗丹明次毒蕈环肽、BODIPY FL phalloidin 可对 F-肌动蛋白进行定量。一种采用荧光黄次毒蕈环肽的流式细胞术可用来证明凋亡过程中 F-肌动蛋白的缺失, 将碘化丙啶 (propidium iodide, P-1304、P-3566) 加入细胞悬液中, 研究人员可估计凋亡和非凋亡细胞群的细胞周期分布。使用罗丹明次毒蕈环肽荧光和溴化乙啶 (ethidium bromide) 荧光的比率, 可在增生的贴壁细胞对 F-肌动蛋白进行定量。使用绿色荧光染料染色 F-肌动蛋白, 同时用高亲和性红色荧光核酸染料如 Alexa Fluor 488 次毒蕈环肽 (A-12379) 和 ethidium homodimer-1 (E-1169) 可改善荧光信号光谱的分离。

用 pyrene iodoacetamide (P-29) 标记的肌动蛋白单体的荧光, 在聚合后可发生改变, 因此这种探针是研究肌动蛋白聚合动力学的极好工具, 也可用来研究肌动蛋白结合蛋白对聚合的效果。

2. Jasplakinolide——一种细胞通透性的 F-肌动蛋白探针 Jasplakinolide (J-7473) 是从海绵 *Jaspis johnstoni* 中分离出来的一种环肽。Jasplakinolide 在体外是一种可引起肌动蛋白聚合的强诱导剂, 可刺激肌动蛋白丝的成核作用, 并可与次毒蕈环肽竞争和肌动蛋白结合 ($K_d = 15 \text{ nmol/L}$)。此外, 与任何其他已知的肌动蛋白稳定剂 (如次毒蕈环肽和 virotoxin) 不同, Jasplakinolide 似乎具有某种程度的细胞通透性, 因此可用来研究活细胞肌动蛋白的聚合。这种肽也有抗真菌、杀虫和抗增殖活性, 可用于研究与肌动蛋白的聚合和解聚有关的细胞处理过程, 包括细胞粘附、移动、内吞作用、囊泡的分检和释放, Jasplakinolide 对细胞因子缺失诱发的凋亡有增强作用。

3. 拉春库林 (Latrunculin) A 和 拉春库林 (Latrunculin) B——细胞通透性的肌动蛋白拮抗剂 拉春库林 (Latrunculin) 是一种得自红海棉 *Latrunculia magnifica* 的高毒大环内酯, 是微丝构建

(organization) 的强力破坏剂。这些 G-肌动蛋白结合化合物抑制受精和早期胚胎的发育, 并可改变细胞的形状。拉春库林 A (L-12370) 在极低的浓度时可与单体 G-肌动蛋白以 1:1 比率结合, 经常用来研究 F-肌动蛋白的解聚对特定生理功能的影响, 如离子转运和蛋白质定位, 在大多数应用中, latrunculin B (L-22290) 的活性模仿了 latrunculin A 的活性。

4. 荧光细胞松弛素 荧光细胞松弛素衍生物可用于活细胞肌动蛋白丝的染色, 细胞松弛素是一组可与肌动蛋白结合并改变其聚合状态的天然化合物。细胞松弛素可以高亲和性 (K_d 值约为 50 nmol/L) 与肌动蛋白有刺端 (barbed end, faster-growing end, 较快生长端) 结合, 包括肌动蛋白有刺端的加帽、解开肌动蛋白丝、增加肌动蛋白装配的速率。细胞松弛素 B 与肌动蛋白其他部位结合, 可增加肌动蛋白装配的速率, 但不具有加帽活性。目前可得到细胞松弛素 D 的绿色荧光 BODIPY FL 衍生物和橙色荧光 BODIPY TMR 衍生物 (C-12377、C-12378)、细胞松弛素 B 的绿色荧光 BODIPY FL 衍生物 (C-12376)。BODIPY TMR 细胞松弛素 D 在 NIH 3T3 成纤维细胞中, 可与俄勒冈绿次毒蕈环肽共存。迁移的人中性粒细胞中荧光细胞松弛素 D 的染色大约在前缘内 1~2 μm 。

5. Cofilin ——一种 F-肌动蛋白解聚因子 高纯度重组鸡肌肉 cofilin (C-22280) 是从大肠杆菌 *Escherichia coli* 分离得到的。Cofilin 与相关的肌动蛋白解聚因子 (ADF) 一起, 在体内促进肌动蛋白丝的解聚, 这一过程需要多种细胞反应参与, 包括胞质分裂 (cytokinesis)、趋化作用和板层状突起 (lamellipodia) 形成。这种低分子量蛋白质 (约 18 800 道尔顿) 普遍存在于真核细胞各种组织中, 在胚胎组织, 发育和变性的肌细胞尤其丰富。在 pH < 7.0 时, cofilin 与 F-肌动蛋白的复合物中, 两种成分的比率为 1:1, 名称即是来源于这种纤维状结构。在 pH > 7.0 时, cofilin 引起肌细胞 G-肌动蛋白增加, 促成肌动蛋白丝尖端的分离。Cofilin 与 F-肌动蛋白的结合导致次毒蕈环肽结合位点的丧失, 也可与原肌球蛋白竞争结合。体内 cofilin 的活性通过 cofilin 的磷酸化进行调节, 磷酸化由 LIM 激酶在 N-末端区域单个丝氨酸残基进行, 磷酸化的 cofilin 既不能与 G-肌动蛋白结合, 也不能同 F-肌动蛋白结合。LIM 激酶则由 Ras 家族的一种小 GTPase 调节。

(五) 肌动蛋白结合蛋白分析

利用某些毒蕈肽与 F-肌动蛋白结合后荧光强度增加的性质, 可作为一种有用的工具来追踪特定肌动蛋白结合蛋白的动力学和结合量。应用罗丹明次毒蕈环肽 (R-415) 荧光强度的改变可确定不同毒蕈肽的解离常数, 与肌动蛋白结合后罗丹明次毒蕈环肽荧光强度的增强也可用来测定溶胶素 (gelsolin) 的动力学。 Mg^{2+} 指示剂 mag-fura-5 (M-3103) 被用来确定这种替代 (severing) 对二价离子浓度的依赖性。罗丹明次毒蕈环肽与肌动蛋白结合的亲和力和比率常数不受肌动蛋白与肌球蛋白亚基-1 或原肌球蛋白的饱和度影响, 提示这两种肌动蛋白结合蛋白结合的部位与次毒蕈环肽结合的部位不同。

二、微管蛋白和其他细胞骨架蛋白探针

包括下列肌动蛋白结合蛋白探针: 重组内皮抑素 (endostatin) 蛋白 (E-23377), 可与原肌球蛋白结合; 荧光磷酸肌醇和相关探针, 包括 cofilin I, 通过 pleckstrin homology (PH) 结构域和其他结合基元 (motifs), 肌动蛋白结合蛋白抗体 synapsin I (A-6442) 可与肌动蛋白结合蛋白结合。

(一) 未标记和荧光性微管蛋白

来自牛脑高纯度的微管蛋白 (T-7451)、俄勒冈绿 514 标记的微管蛋白 (T-12391) 和四甲基罗丹明标记的微管蛋白 (T-7460, 彩图 23), 可用来在体内或体外研究微管的动力学, 每一微管二聚体含有 1~2 个俄勒冈绿 514 或四甲基罗丹明荧光团。在包装前, 经过三次温度依赖的聚合/解聚循环以选择功能亚基。

四甲基罗丹明标记的微管蛋白被用来直接观察细胞周期依赖的微管蛋白动态变化、*Xenopus* 卵母细胞提取物有丝分裂纺锤体形成、神经元微管蛋白的转运、用抗微管试剂处理后细胞内荧光强度的缺失。使用四甲基罗丹明标记的微管蛋白和 GTP 包被的微珠 (如黄绿色荧光的 FluoSpheres 微球), Mitchison

已经确定出一种可交换的 GTP 结合位点位于 paclitaxel 稳定的荧光微管蛋白的正端, 提示 β 微管蛋白暴露于正端, 而 α 微管蛋白位于微管的负端。

(二) 微管选择性探针

1. 抗 α 微管蛋白单克隆抗体 抗 α 微管蛋白单克隆抗体 (A-11126) 与抗小鼠第二抗体免疫试剂联合应用, 研究人员可对固定细胞、不同种属动物或人体固定或冰冻组织切片的微管进行观察。这些单克隆抗体可识别 N-末端结构域的 69~97 氨基酸残基, 可用 ELISA 或 Western blot 检测微管蛋白、筛选表达文库, 也可作为探针检测 α 微管蛋白 N-末端结构域。抗 α 微管蛋白单克隆抗体可以是未标记的形式 (A-11126), 也可以是生物素-XX 交联物 (A-21371)。生物素化的抗体, 则可应用许多荧光团或酶标记的卵白素、链亲和素、NeutrAvidin 生物素结合蛋白交联物、NANOGOLD 和 Alexa Fluor FluoroNanogold 链亲和素 (表 23-37) 进行检测 (彩图 24)。

使用小鼠 IgG₁ 独特型抗 α 微管蛋白, 采用 Zenon One 技术进行抗体标记, 取得了良好的结果, 标记可在数分钟内完成, 主要步骤如图 23-22。

2. Paclitaxel Paclitaxel (P-3456) 以前也称为紫杉酚 (taxol), 是一种抗癌药物。Paclitaxel 促进微管蛋白的组装、产生聚合物, 这种聚合物不能通过稀释、钙离子、寒冷或许多破坏微管蛋白的药物解聚。培养细胞用 paclitaxel 处理后, 被阻断于细胞周期的 G₂ 和 M 期。

3. 荧光 Paclitaxel 交联物 三种常用的 paclitaxel 荧光衍生物为俄勒冈绿 488 paclitaxel (Flutax-2, P-22310), BODIPY FL paclitaxel (P-7500) 和 BODIPY 564/570 paclitaxel (P-7501)。这些荧光 paclitaxel 衍生物是对微管形成和运动进行研究的有用工具, 也是筛选影响微管装配化合物的有用试剂。俄勒冈绿 488 paclitaxel 是一种标记活细胞微管蛋白丝的重要探针, 这种探针的荧光标记是通过母体 paclitaxel 的 7-羟基衍生作用附着上的, 这种方式使得探针在 37°C 条件下, 可以高亲和力 (K_d 约 10⁻⁷ mol/L) 与微管蛋白选择性结合。俄勒冈绿 paclitaxel 可用来筛选 paclitaxel (Taxol) 的生物类似物 (biomimetics)。使用俄勒冈绿 488 paclitaxel 已成功标记了活 HeLa 细胞、NIH 3T3、A10 和 BC3H1 细胞的微管, 用俄勒冈绿 488 paclitaxel 也可染色 *Xenopus laevis* 和牛脑的微管。

用反应性荧光团对微管蛋白进行化学修饰, Melan 描述了一种用 BODIPY paclitaxel 衍生物生成荧光微管的方法, 这些微管在室温下可保持稳定一周或更长时间。与用俄勒冈绿 488 衍生物相反, BODIPY FL 和 BODIPY 564/570 paclitaxel 衍生物在大多数情况下不适合标记细胞内的微管蛋白。

4. BODIPY FL 长春碱 BODIPY FL 长春碱 (V-12390) 是抗癌药长春碱的荧光类似物, 是进行微管蛋白标记或研究药物转运机制的有用探针。长春碱通过在微管末端加帽而抑制细胞增殖, 因此可抑制有丝分裂纺锤体微管的动力学。另一种荧光长春碱衍生物是长春碱 4'-(邻)氨基苯甲酸盐(或酯), 可与 β -微管蛋白初级序列的中央区结合, 抑制微管蛋白聚合。

另外, 长春碱细胞内的积聚与 P-糖蛋白上长春碱特异性的调节位点有关, 该糖蛋白是一种药物流出泵 (drug-efflux pump), 在多药抗性 (MDR) 细胞过表达, 这种高度亲脂的 P-糖蛋白底物可用来研究 P-糖蛋白在药物穿透血脑屏障方面的作用, 荧光标记的长春花碱可用来测定 MDR 细胞药物转运的动力学。

5. 其他微管蛋白探针 核染料 DAPI (D-1306、D-3571、D-21490) 可与体外纯化的微管蛋白牢固结合, 不影响微管装配或 GTP 水解。DAPI 与微管蛋白结合的部位与 paclitaxel、秋水仙碱和长春碱不同, 与微管蛋白的结合伴随着吸收光谱的移位和荧光强度的增加。DAPI 与聚合微管蛋白的亲和力比二聚体微管蛋白大 7 倍, 因此 DAPI 是研究微管装配动力学的敏感工具。

双 ANS (B-153) 是体外微管装配的有力抑制剂, 这种荧光探针与蛋白质的疏水性裂隙结合, 亲和力比 1,8-ANS (A-47) 高 10~100 倍, 结合后荧光强度显著增强。双-ANS 与微管蛋白的结合位点靠近微管装配的重要接触区域, 但与秋水仙碱、长春花碱、鬼臼毒素和美登素 I 的结合位点截然不同, 远离抑制有丝分裂药物的结合位点, 结合后有荧光增强现象。双-ANS 可作为探针, 用来研究在时间和温度依赖的退化中微管蛋白单体和二聚体的结构改变。

表 23-37 常用卵白素、链亲和素、NeutrAvidin 和 CaptAvidin 交联物

标记物 (最大吸收/发射波长) *	链亲和素	NeutrAvidin	卵白素	CaptAvidin
荧光交联物				
Alexa Fluor 350 (346/442)	S-11249	A-11236		
Marina Blue dye (365/460)	S-11221	A-11230		
Cascade Blue dye (400/420)	A-2663			
Pacific Blue dye (410/455)	S-11222			
Alexa Fluor 430 (431/541)	S-11237			
Fluorescein (494/518)	S-869	A-2662	A-821	
Alexa Fluor 488 (495/519)	S-11223	A-21370		
Oregon Green 488 (496/524)	S-6368	A-6374		
FluoSpheres (505/515)	F-8780	F-8771		
Oregon Green 514 (511/530)	S-6369			
Alexa Fluor 532 (530/554)	S-11224			
Alexa Fluor 546 (556/575)	S-11225			
Alexa Fluor 555 (555/565)	S-21381			
Tetramethylrhodamine (555/580)	S-870	A-6373		
R-Phycoerythrin (496/578)	S-866	A-2660		
Rhodamine B (570/590)	S-871			
Rhodamine Red-X dye (570/590)	S-6366	A-6378		
Alexa Fluor 568 (578/603)	S-11226			
Alexa Fluor 594 (590/617)	S-11227			
Texas Red dye (595/615)	S-872	A-2665	A-820	
Texas Red-X dye (595/615)	S-6370			
Alexa Fluor 633 (632/647)	S-21375			
Alexa Fluor 647 (650/668)	S-21374			
Alexa Fluor 647-R-PE (496/668)	S-20992			
Allophycocyanin (650/660)	S-868			
Alexa Fluor 660 (663/690)	S-21377			
Alexa Fluor 680 (679/702)	S-21378			
Alexa Fluor 680-R-PE (480/702)	S-20985			
Alexa Fluor 680-allophycocyanin (650/702)	S-21002			
Alexa Fluor 700-allophycocyanin (650/723)	S-21005			
Alexa Fluor 750-allophycocyanin (650/775)	S-21008			
Alexa Fluor 700 (702/723)	S-21383			
Alexa Fluor 750 (749/775)	S-21384			
其他交联物				
琼脂糖	S-951			C-21386
碱性磷酸酶	S-921			
β -半乳糖苷酶	S-931			
辣根过氧化物酶	S-911	A-2664		
NANOGOLD	N-24918			
Alexa Fluor FluoroNanogold	A-24926, A-24927			
CMNB-caged fluorescein	S-21380			
Acrylamide	S-21379			C-21387
未标记卵白素				
未标记	S-888	A-2666	A-887, A-2667	C-21385

* 交联物近似的最大吸收和荧光发射波长 (nm)

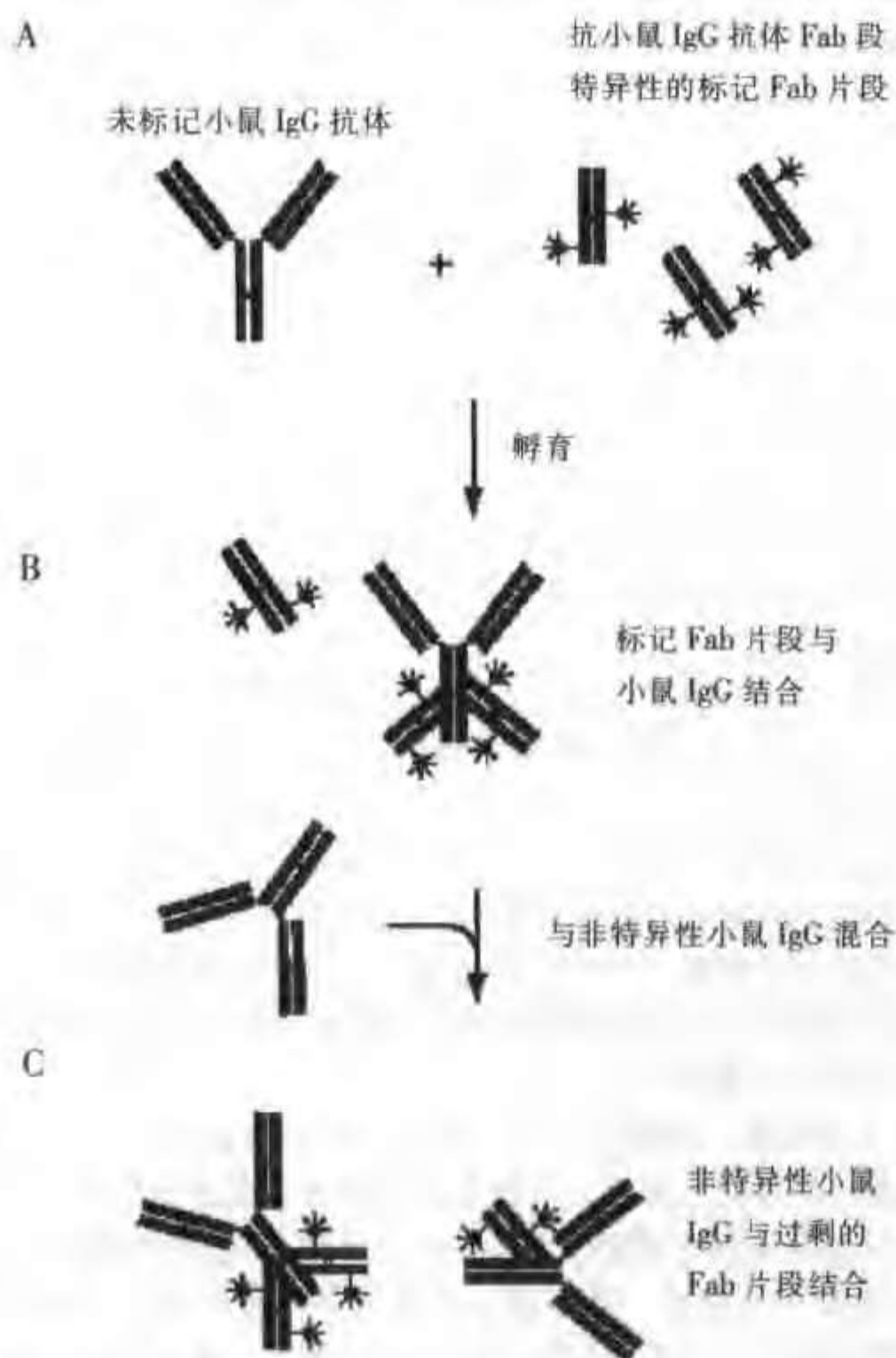


图 23-22 使用 Zenon One 抗体标记试剂盒标记图解。未标记的小鼠 IgG 用荧光团标记的 Fc 段特异的抗小鼠 Fab 片段 (A) 进行孵育, 标记的 Fab 片段可与小鼠 IgG Fc 段结合 (B), 过剩的 Fab 片段, 通过加非特异性的小鼠 IgG 进行结合 (C)。实验中存在多种小鼠 IgG 第一抗体可防止 Fab 片段的交叉标记。注意 Fab 片段的标记物可以是荧光团, 也可是酶 (如 HRP) 或生物素

DCVJ [4-(dicyanovinyl) julolidine; D-3923] 可与微管蛋白二聚体的特异位点结合, 是研究活细胞微管蛋白聚合的有用探针。DCVJ 对活细胞的染色可大部分被细胞松弛素 D 阻断, 另外, DCVJ 与牛脑的钙调素结合后可发出强的绿色荧光, 可用于钙调素的研究。微管蛋白的疏水表面可使用环境敏感的探针 nile red (N-1142) 和氟硅酸钠 (prodan, P-248) 进行研究。

(三) 其他细胞骨架蛋白探针

1. 磷酸肌醇和相关产物 许多肌动蛋白结合蛋白, 包括 cofilin (C-22280)、前纤维蛋白 (profilin)、溶胶素 (gelsolin)、纽蛋白 (vinculin)、dystrophin 和 talin 都可与磷酸肌醇——尤其是 phosphatidylinositol 4,5-diphosphate [PtdIns (4, 5) P₂]——通过磷酸肌醇结合基元 (motifs) 结合, 基序包括 C₂ (PKC-保守区 2)、PH (pleckstrin homology)、FYVE (Fab1p/YOTF/Vac1p/EEA1)、ENTH (Epsin NH₂-terminal homology) 和 PX (phox or phagocyte oxidase) 同源结构域。因此, BODIPY 磷酸肌醇磷酸盐、将这些探针转入活细胞的穿梭式 PIP 载体 (Shuttle PIP carrier) 和其他磷脂酰肌醇相关的产物-PIP 条 (Strips)、PIP MicroStrips membranes、PIP 阵列膜 (Array membranes)、PIP 珠 (Beads) 都可用来在溶液中和在细胞内检测肌动蛋白结合蛋白。

2. 抗胶质纤维酸性蛋白 (GFAP) 抗体 分子量 50 000 道尔顿的Ⅲ型中间丝蛋白称为胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP), 是星形胶质细胞和某些室管膜上皮的主要结构成分。GFAP 可与钙结合蛋白 annexin II2-p11 (2) 和 S-100 结合, 与这些蛋白质的结合可通过磷酸化作用调节 GFAP 的聚合。星形胶质细胞对脑损伤可发生增生性反应 (胶质增生), 胶质细胞增生的最初反应是 GFAP 表达增加。用 GFAP 抗体和它的 Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 594 交联物 (A-21294、A-21295) 可帮助鉴定细胞的胶质谱系, 并可协助进行临床病理诊断。

在自身免疫失调患者 GFAP 的表达具有独特的特点。在中枢神经系统, GFAP 主要在星形细胞和室管膜细胞表达, 而在周围神经系统, 主要在 Schwann 细胞、卫星细胞、肠神经胶质细胞表达。神经胶质细胞起源的肿瘤含有大量 GFAP, 在下列组织器官未观察到 GFAP 阳性表达: 皮肤、结缔组织、脂肪组织、淋巴组织、肌肉、胃肠道包括肝脏和胰腺、肾、输尿管和膀胱。分子探针公司的抗 GFAP 与波形蛋白不存在交叉反应, 波形蛋白经常与胶质瘤细胞和某些星形细胞共表达, 与 Bergmann 胶质瘤或其他胶质细胞来源的肿瘤也不存在交叉反应。

3. 抗结蛋白抗体 结蛋白, 由属于中间丝蛋白基因家族的基因编码, 是成熟骨骼肌、心肌和平滑肌的主要中间丝标志物。尽管不是所有肌组织都含有结蛋白 (如大动脉平滑肌则不含结蛋白), 但横纹肌和平滑肌细胞都可被抗结蛋白抗体标记。结蛋白可用来将横纹肌肉瘤和平滑肌肉瘤与其他的波形蛋白阳性的肿瘤区分开, 由此可进行诊断和鉴别诊断。分子探针公司提供一种 IgG₁ 独特型的抗结蛋白小鼠单克隆抗体 (A-21283), 可使用相应的荧光二抗进行检测, 这种抗体可作为软组织肉瘤的分型标志使用。Zenon One 标记试剂盒可用来制备各种颜色荧光标记小鼠 IgG₁ 独特型抗结蛋白荧光交联物, 也可用酶标记抗体 (图 23-22)。抗结蛋白免疫组织化学染色可将浆液性胸水中间皮细胞和癌细胞 (尤其是肺腺癌) 区分开, 因此对于临床病理诊断也有重要作用。

4. 抗突触素 (synapsin) I 抗体 突触素 I 是一种肌动蛋白结合蛋白, 专一定位于突触小泡, 因此可作为脑和其他神经组织突触的极好的标志物。突触素 I 抑制神经递质的释放, 这种作用可由于 Ca^{2+} /钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II 引起的突触素 I 的磷酸化而失效。亲和纯化的多克隆兔抗突触素 I 抗体 IgG 片段 (A-6442) 可用来分析突触素 I 的定位、富集度, 可采用 Western blot、免疫组织化学、酶联免疫吸附 (ELISA) 或免疫沉淀法进行测定。抗牛突触素 I 抗体可识别人、大鼠和小鼠的突触素 I, 和突触素 II 基本上不存在交叉反应。

5. 内皮抑素 (endostatin) 蛋白 血管发生抑制剂内皮抑素是一种内源性的, 分子量 20 000 道尔顿的 XV Ⅲ胶原蛋白羧基末端片段 (彩图 10), 可诱导小鼠肿瘤的消退。

尽管内皮抑素产生作用的机制仍在研究之中, 但研究人员已经发现内皮抑素可引起凋亡因子和细胞增殖基因的抑制, 包括 c-myc 基因表达, 因此可产生很强的抗转移活性。在细胞表面, 内皮抑素可与 glypican 或跨膜硫酸乙酰肝素蛋白多糖 (heparan sulfate proteoglycans)。一旦被吞入细胞后, 该蛋白就可与原肌球蛋白结合, 可通过减慢肌动蛋白丝的解聚使肌动蛋白丝的尖端 (pointed-end) 保持稳定。内皮抑素可间接诱导胞质液内 Ca^{2+} 和 cAMP。分子探针公司提供重组的内皮抑素蛋白 (E-23377) 供研究使用。也可提供 Alexa Fluor 488 内皮抑素蛋白交联物 (E-23378)。另一种研究血管发生的蛋白, 重组 Angiostatin 蛋白目前也能得到 (A-23375), 它的 Alexa Fluor 488 交联物正在研制之中 (A-23376)。

第二十四章 荧光探针的选择和应用

第一节 选择荧光探针的注意事项

激光扫描共聚焦显微镜是 20 世纪 80 年代发展起来的一种新型高精度显微镜系统, 辅以各类荧光探针或荧光染料与被测物质特异性结合, 不仅可观察固定的细胞、组织切片, 还可对活细胞的结构、分子、离子进行实时动态地观察和检测。荧光探针的发展非常迅速, 目前仅美国 Molecular Probes 公司就可提供数千种荧光探针, 每年该公司还不断推出新的荧光探针。通常每项检测内容或被测物质都有几种或几十种有关的或特异的荧光探针。

一、选择荧光探针的一般考虑

选择合适的荧光探针是有效地进行实验并获取理想实验结果的保障, 荧光探针的选择主要从以下几个方面考虑:

1. **仪器所采用激光器的类型** 应根据仪器采用激光器的类型进行探针选择, 如采用氩/氦离子激光器的激光扫描共聚焦显微镜 (Bio-Rad 1024, 美国 Bio-Rad 公司产品), 激发波长为 488nm、568nm、647nm、可激发多种荧光探针。
2. **荧光探针的光稳定性和光漂白性** 在进行荧光定量和动态荧光监测时, 要求荧光探针有较好的光稳定性, 也可通过减少激光扫描次数或降低激光强度的方法, 来减轻光漂白的程度。但在进行膜流动性或细胞间通讯检测时则要求荧光探针既有一定的光稳定性又要有一定的光漂白性。
3. **荧光的定性或定量** 仅做荧光定性或仅是观察荧光动态变化时, 选择单波长激发探针, 无需制作工作曲线; 做定量测量时最好选用双波长激发比率探针, 利于制定工作曲线。
4. **荧光探针的特异性和毒性** 尽量选用毒性小、特异性高的探针。
5. **荧光探针适用的 pH** 大多数情况下细胞的 pH 在生理范围内, 但当 pH 不在此范围时, 考虑适用该环境 pH 的荧光探针是有必要的, 同时应注意染液自身的 pH 值会影响带电荷的荧光探针与胞内组分之间的结合, 因此在染液的配备时需加以考虑。

二、使用荧光探针的注意事项

不同的荧光探针在不同标本的效果常有差异, 除综合考虑以上因素以外, 有条件者应进行染料的筛选, 以找出最适的荧光探针。此外, 许多荧光探针是疏水性的, 很难或不能进入细胞, 需使用其乙酰羟甲基酯 (acetoxymethyl, AM) 形式, 也就是荧光探针与 AM 结合后变成不带电荷的亲脂性化合物易于通过质膜进入细胞, 在细胞内荧光探针上的 AM 被非特异性酯酶水解, 去掉 AM 后的荧光探针不仅可与细胞内的靶结构或靶分子结合且不易透出质膜, 从而能有效地发挥作用。

第二节 激光扫描共聚焦显微镜常用的荧光探针

激光扫描共聚焦显微镜检测内容 and 应用范围非常广泛, 以下仅简单介绍 LSCM 常用的检测内容及其荧光探针。

一、细胞内游离钙

美国分子探针公司提供的钙荧光探针有 20 多种, 激光扫描共聚焦显微镜常用的有 Fluo-3、Rhod-1、Indo-1、Fura-2 等, 前两者为单波长激光探针, 利用其单波长激发特点可直接测量细胞内 Ca^{2+} 动态变化, 为钙定性探针; 后两者为双波长激发探针, 利用其双波长激发特点和比率技术, 能定量细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 为钙定量探针, 这些探针需使用其 AM 形式。与 Fluo-3 与 Indo-1、Fura-2 等探针相比, 它的荧光发射峰波长较长, 荧光选择性强, 自身无荧光, 与游离钙结合后才发出荧光, 能有效地避免非特异性染色。Fluo-3 不需要紫外光激发, 避免了紫外光对活细胞样品的损伤, 不需制作工作曲线, 还能够在测钙的同时检测细胞的其他参数。如需定量细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, 可联合使用 Fluo-3 和 Fura Red 2, 两者联合使用既具有双波长激发探针的优点又具有单波长激发探针的优点。Fura Red 2 是一种独特的 Ca^{2+} 荧光探针, 荧光强度随着 Fura Red 2 和 Ca^{2+} 结合的增加而减少, 即荧光强度与游离钙浓度成反比, 与 Fluo-3 正好相反。因此, Fluo-3 和 Fura Red 2 联合使用, 不仅可提供一种定量细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的比率方法, 还可增加 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 检测的灵敏度。

定量细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 也可用双波长激发探针 Indo-1 和 Fura-2, 由于这些探针需用比率技术, 因此又称为钙比率探针。例如, Indo-1 荧光探针经 320~360nm 波长紫外光激发后细胞内游离的 Indo-1 发出 485nm 荧光, 与 Ca^{2+} 结合的 Indo-1 发出 405nm 荧光, 两者的比值与细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 成线性关系, 此比值与工作曲线相比即可得出细胞内游离钙的浓度。钙比率探针在溶液中均有荧光, 测量时需洗去细胞外液探针, 而进入细胞后的探针其 AM 被分解后不能透出质膜。由于这些探针要用紫外激发光作激发光源, 会造成细胞的损伤, 还会增加潜在的自发荧光, 而且荧光发射峰波长也较短, 需提高发光强度, 因而其使用受到一定的限制。

二、DNA 和 RNA

核酸的荧光探针有 50 多种, 用于激光扫描共聚焦显微镜的主要有 Acridine Orange (吖啶橙, AO)、Propidium Iodide (碘化丙啶, PI)。两种染料既可标记 DNA 又可标记 RNA, 如为获得单独的 DNA 或 RNA 分布, 染色前可用 RNA 酶或 DNA 酶处理细胞。PI 不能进入完整的细胞膜, 故不能标记活细胞内的 DNA 和 RNA。其他较常用的荧光探针还有 Hoechst 33258、Hoechst 33342、7-aminoactinomycin D (7-氨基放线菌素 D, 7-AAD)、Chromomycin A3 (色霉素 A3)、Thiazole orange (噻唑橙) 等。其中 Hoechst 33258 和 Hoechst 33342 为 DNA 特异性荧光探针, 它们以非嵌入形式结合在 DNA 的 A-T 碱基区, 可对活细胞的 DNA 进行荧光染色, 但需紫外光激发。7-AAD 和 Chromomycin A3 也是 DNA 荧光探针, 能以非嵌入的方式与 DNA 的 G-C 碱基对结合; Thiazole orange 则是 RNA 荧光探针。

三、膜电位

以往测定膜电位多用微电极直接插入法测量, 不仅操作麻烦, 而且对细胞也是一种损伤。激光扫描共聚焦显微镜则可利用荧光探针在细胞膜内外分布的差异测出膜电位, 不但可以观察细胞膜电位的变化结果, 更重要的是可以用于连续监测膜电位的迅速变化。膜电位荧光探针根据其对膜电位变化反应速度的快慢分为快、慢两类探针, 各类均有 10 多种。快反应染料对膜电位的变化可在数毫秒内作出反应, 适用于测量膜电位快速变化的细胞, 如神经细胞、心肌细胞等; 而慢反应染料的反应速度则相对较慢(几秒或几分钟)。但快反应染料对膜电位的敏感性较低, 产生的荧光变化较小, 一般膜电位每变化 100mV 时荧光强度变化 2%~10%; 而慢反应染料对膜电位的敏感性较强, 膜电位变化幅度为 1mV 时荧光强度变化 1%~2%。DiBAC₄ (3) 为最常用的膜电位荧光探针, DiBAC₄ (3) 为带负电荷的阴离子慢反应染料, 该探针本身无荧光, 当进入细胞与胞浆内的蛋白质结合后才发出荧光, 测量时要求细胞浸在荧光染料中。当细胞内荧光强度增加即膜电位增加提示细胞去极化; 反之, 细胞内荧光强度降低即膜电位降低提示细胞超极化。Rhodamine 123 主要用于线粒体膜电位测量, Rhodamine 123 是一种亲脂性阳离子荧光探针, 当线

粒体膜内侧负电荷增多时, 荧光强度增加, 与 DiBAC₄ (3) 的表示形式相反。

四、pH 值

正常细胞胞浆内的 pH 一般在 6.8~7.4 的范围, 而某些细胞器如溶酶体的 pH 则在 4.5~6.0 之间。根据检测对象 pH 的不同将荧光探针分为偏中性和酸性两类。常用于偏中性 pH 即细胞胞浆 pH 检测的荧光探针有 SNARF 类 (SNARF-1、SNARF-calcein)、SNAFL 类 (SNAFL-1、SNAFL-calcein)、BCECF 等, 这些探针均为疏水性探针, 需使用其 AM 形式。FITC-dextran 适用于 pH 范围 4~6 之间, 如溶酶体 pH 的检测, 该探针也不能透过质膜, 但可通过细胞胞饮作用进入溶酶体, 因此应选择分子量稍小的 Dextran (葡聚糖)。

五、细胞内活性氧

活性氧 (active oxygen species) 可影响细胞代谢, 与蛋白质、核酸、脂类等发生反应, 有些反应是有害的, 因此测量活性氧在毒理学研究中有一定的意义。根据检测活性氧的不同可选择不同的荧光探针。常用荧光探针有 Dichlorodihydrofluorescein diacetate (2, 7-二氯二氢荧光素乙酰乙酸、H₂DCFDA), 其原理是不发荧光的 H₂DCFDA 进入细胞后能被存在的过氧化物、氢过氧化物等氧化分解为二氯荧光黄 (dichlorofluorescein, DCF) 而产生荧光, 其反应灵敏到 10⁻¹² mol/L 水平, 荧光强度与活性氧的浓度呈线性关系。

六、细胞间通讯

激光扫描共聚焦显微镜可采用荧光光漂白恢复 (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) 技术检测细胞缝隙连接通讯, 该方法的原理是一个细胞内的荧光分子被激光漂白或淬灭, 失去发光能力, 而临近未被漂白细胞中的荧光分子可通过缝隙连接扩散到已被漂白的细胞中, 荧光可以逐渐恢复。由于光漂白过程是不可逆的, 因此可通过观察已发生荧光漂白细胞其荧光恢复过程的变化量来判断细胞缝隙连接的通讯功能。采用 FRAP 技术检测细胞间通讯常用荧光探针是 6-carboxyfluorescein diacetate (6-羧基荧光黄乙酰乙酸盐、CFDA), 需用其酯化形式 CFDA-AM。该技术可用于研究胚胎发生、生殖发育、神经生物学、肿瘤发生等过程中缝隙连接通讯的基本机制和作用。由于某些毒性物质尤其是促癌物可影响缝隙连接介导的物质运输, 因此该方法也可用于鉴别对缝隙连接作用有潜在毒性的化学物质。

七、细胞膜流动性

采用荧光光漂白恢复 (FRAP) 技术还可对细胞膜流动性进行研究。利用 NBD-C₆-HPC 荧光探针标记细胞膜磷脂, 然后用高强度的激光束照射活细胞膜表面的某一区域 (1~2 μm), 使该区域的荧光淬灭或漂白, 再用较弱的激光束照射该区域。可检测到细胞膜上其他地方未被漂白的荧光探针流动到漂白区域时的荧光重新分布情况。荧光恢复的速率和程度可提供有关的信息, 如用于观察细胞受体介导内吞过程中膜磷脂流动性的变化情况。NBD-C₆-HPC 在温度稍高时可能会进入细胞内, 因此荧光染色和测量时应在低于常温的环境下进行。

八、细胞亚微结构 (细胞器) 探针

一般的光学显微镜由于分辨率有限, 在观察细胞器结构时受到一定的限制, 而激光扫描共聚焦显微镜可获得较一般普通光学显微镜分辨率高的细胞内线粒体、高尔基复合体、内质网、溶酶体等细胞器图像, 同时还可动态观察活细胞状态下细胞器的形态学变化情况, 此外还可通过光学切片即断层扫描技术进行三维重建, 显示细胞器的空间关系及其变化。适用于线粒体的荧光探针较多, 如 Mitotracker、DA SPM1、DA SPE1、JC-1、罗丹明 123 等; 高尔基复合体常用的荧光探针有 NBD 酰基鞘氨醇 (ceramide)、

BODIPY 酰基鞘氨醇；内质网主要用 Dil、DiOC₆(3)；溶酶体的荧光探针有 DAMP、neutral red。有报道选用 NBC-PC 标记细胞膜、Mitotracker 标记线粒体（彩图 41）、Hoechst 33342 标记细胞核 DNA，同时显示细胞的三部分结构。

九、标记抗体、配体等常用的荧光探针

激光扫描共聚焦显微镜不仅可用免疫荧光分析固定的细胞或组织切片，还可用于分析活细胞，得到特异性抗体或其他荧光免疫探针识别靶分子的表达、定位、分布变化等信息。标记抗体、配体或蛋白质等较通用的有异硫氰酸荧光素（Fluorescein isothiocyanate, FITC），在碱性条件下 FITC 的异硫氰酸基与免疫球蛋白的自由基经碳酰胺化而形成硫碳胺基键，成为标记荧光免疫球蛋白，即荧光抗体，一个 IgG 分子上最多能标记 15~20 个 FITC 分子。但 FITC 易产生光漂白现象，发射带较宽，故在用于双标记时会和其他染料的发射带重叠，且带负电荷，对 pH 值的变化较敏感，因而限制了其在活细胞检测中的应用。目前较 FITC 优越且备受推崇的荧光探针是 Bodipy 类，它可用于标记蛋白质、核苷酸、葡聚糖、酶类、脂肪酸、各类受体的配体等，其光稳定性好、发射带窄、和其他荧光探针的重叠更小，利于多重标记。Bodipy 的亲脂性好，在不同 pH 值条件下较稳定，从而有利于用于生物膜、受体、细胞骨架蛋白等活细胞动态方面的研究。

十、检测酶活性的荧光探针

激光扫描共聚焦显微镜除了具备荧光显微镜检测荧光酶细胞化学的作用以外，在检测活细胞酶活性动态变化方面有着无可比拟的优势，通过对细胞进行不同的处理因素可检测细胞内相应的酶被激活或灭活的动态变化过程。有的酶荧光探针自身就可发出荧光、有的是与酶结合后发出荧光、有的则是被酶分解后发出荧光。例如用荧光探针 monochlorobimane (MCB) 测量细胞中的谷胱甘肽转移酶 (GST)，MCB 与 GST 结合后才可发出荧光，由于 GST 能保护细胞免受自由基损害和化学损伤，因此该方法可用于细胞毒理学、细胞抗药性等方面的研究。

以往记录荧光信号的仪器主要有荧光显微镜、荧光分光光度仪、流式细胞仪等。与这些仪器相比，激光扫描共聚焦显微镜不仅可广泛用于荧光定性、定量测量，同时具备细胞断层扫描、三维图像重建、活细胞动态荧光监测、荧光光漂白恢复、激光显微外科等方面的功能。此外，激光扫描共聚焦显微镜还可用于多重荧光染色的检测，如同时观察细胞膜、细胞器、细胞核结构，也可同时检测细胞内游离钙和 pH 或膜电位等的动态变化，如 Bio-Rad 1024 激光扫描共聚焦显微镜有三个检测器可进行三色的同步标记和检测（彩图 29~彩图 42）。总而言之，激光扫描共聚焦显微镜可进行多参数、多功能的研究，且快速、准确、自动化程度高，是检测组织细胞荧光信号的最为新颖和先进的技术手段。

第三节 激光扫描共聚焦显微镜中荧光探针的使用

本节主要叙述荧光探针的种类、注意事项、应用技巧、操作规程以及荧光探针使用的一般建议，尤其着重介绍用于激光扫描共聚焦显微镜 (LSCM) 的荧光探针。

关于荧光和荧光技术的叙述可参考本书的有关章节，也可在专门的使用手册中找到详细的资料。一些公司（如 Molecular Probes）的 Web 页上可查阅到相应荧光探针的光谱、使用注意事项、材料安全数据表（Material Safety Data Sheets, MSDS）以及荧光探针商品目录的最新更新版本。一些 LSCM 应用的荧光探针和一些新的染料不断被开发出来。

在以下的叙述中，所选用例子中应用荧光探针，提供的相关资料可能并不全面，必要时，详细的操作步骤请查阅相应文献。另外，本章讨论的荧光探针仅涉及单光子激发的共聚焦显微镜，对于一些在多光子激发时激发光谱相似，但在单光子激发时，其激发光谱不同的荧光探针应特别注意。多光子激发的

LSCM 是一种用途广泛的新技术,多光子激发 LSCM 采用短波长、高强度脉冲的红外线 (IR) 照射标本。在焦点上,光子的密度足够高,可保证荧光团同时吸收两个或两个以上的光子。与单光子激发情况相似,吸收了 IR 光子能量的荧光团,则通过发射光子再回到基态。与单光子 LSCM 相比,其激发局限于很小的区域,因此光漂白作用和发生其他光化学反应 (包括笼锁化合物的释放) 的范围也大大缩小了。此外,因为所有的发射光线都是由很局限的区域内产生的,不需要采用针孔来消除来自焦点以外的光线。从原则上将采集的发射光的量大大增加。这种技术的简要描述可查阅 IMR 的 Web 页 (<http://www.bocklabs.wisc.edu/imr/facility/2p.htm>)。另外,还应注意一些紫外光 (UV) 激发的荧光探针,如 Indo-1 也可通过这种方法激发,而不需使用 UV 照射,也不要 UV 滤光片校正。这种方法确实具有一定的局限性:对于给定的荧光探针,采用多光子激发,其空间分辨率比应用单光子激发的 LSCM 低。而且,样品中如存在吸收激发波长的 UV 发色团,可能产生高温造成标本的损伤。目前这一技术广泛应用的主要障碍是仪器的耗费十分昂贵,尤其是模式-锁激光器 (mode-locked laser) 的消耗。

一、购买荧光探针的一般考虑

(1) 购前最好先通过荧光探针供应商了解所要使用荧光探针的特点,在一些公司的荧光探针,探针包装附件材料非常详细,可提供荧光探针使用 and 操作的描述。

(2) 在购买荧光探针前,最好能查阅出版的文献资料,不要仅仅依赖供应商引述的一些参考文献,这些文献可作为入门的参考,但最好能检索到与你的研究内容密切相关的文献,而且应尽量找到最新的文献。

(3) 通过应用特定的检索指标 (如 Medline 中的 “CAS NO”) 查找荧光探针文献。“CAS NO” 指的是化学文摘号 (Chemical Abstracts number),是用 “唯一的” 5~9 个数字来代表一种特定的化学物质,该数字常分配给这种化合物的天然形式,偶尔其盐类形式也被分配给单独的 CAS NO。CAS 号也被分配给一类物质,如葡聚糖。对于酶类,则以 Enzyme Commission of the International union of Pure and Applied Chemistry 分配的酶的 EC 编号开始。在老的条目中, RN (登记号) 字段就是 CAS 号。特定的数据库可利用一些检索条目进行检索,索引 (Index) 是数据库记录引用条目的一部分 (如, “AU” 指作者)。Medline 中有用的索引除 “CAS NO” 外,还包括 “CH” (化学名), “XCH” (准确的化学名), EC 编号可用来查找其 “CAS” 号,如 “FIND CAS NO EC2.7.1.2” 检索的是引用葡萄糖激酶的文献。以完全的方式可显示所有的索引内容,包括 “CAS NO” 和 EC 编号。其他数据库,如 Biosis,可使用化学名作为关键词进行检索,但没有特定的化学名索引。

(4) 总之,在购买荧光探针前,一定要确定你购买探针的目的,并根据需要进行购买。

二、探针选择

(1) 一般情况下,选择的荧光探针应与要研究的结构有密切的关系,可提供较强的荧光信号,光漂白作用缓慢并无毒性。用于 LSCM 的荧光探针还要考虑激光的激发波长、探针的激发和发射光谱以及用于采集的共聚焦显微镜滤片组的设定等。选择可被 LSCM 激光器的激光波长所激发的荧光探针,荧光探针的最大吸收波长 (差不多在所有情况下,荧光探针的激发光谱与其吸收光谱相同) 应在激发波长上或尽量靠近其波长范围。激发波长不一定正好位于荧光探针的最大吸收波长处,只是对于一定的荧光探针来说,在最大波长处激发其激发系数最大。

(2) 应注意检查荧光探针在溶剂系统中的发射光谱,选择的溶剂系统与要用的溶液近似。许多荧光探针的最大激发/发射光谱是使用非生理性溶剂测得的,许多荧光探针的发射光谱随着探针环境的不同而成函数改变。激发光谱较少受影响,但也有例外,如 Nile Red 的激发和发射光谱随着溶剂极性的降低,偏移 to 更短的波长范围。

(3) 选择荧光强度较强的荧光探针。与单独使用光量子产生率作为测量指标完全不同,使用荧光

强度作为指标非常重要。如荧光黄 ($\epsilon \approx 70\,000$, $Q_f \approx 0.9$) 和 Cy5 ($\epsilon \approx 200\,000$, $Q_f \approx 0.3$) 光量子产生率差别很大, 但其荧光强度几乎相同。在采集时, 降低光度学的增益 (gain) 有利于降低噪音, 尽管荧光探针的实际 Q_f (在某种程度上, 还包括其 ϵ) 依赖于实验条件。在分析情况下得到的较高的 Q_f 和 ϵ 数值, 在实际应用中很难达到。

(4) 当在同一实验中要应用两种或两种以上的荧光探针时, 注意它们的激发和发射光谱应尽量分开, 避免发生发射光谱的重叠。“渗透 (bleedthrough)” 指的是在较长的波长通道中检测到某些短波长荧光探针信号的情况。渗透现象可做某种程度的补偿, 例如, 可从一幅图像中经加权减去另一幅图像, 但成功率不高。

(5) 通过校正相应的荧光滤片, 以适当的效果采集荧光探针的发射光谱。应注意“通用”的滤片组可能与你使用的荧光探针的光谱并不匹配。还应注意通过光学部分 (包括滤片) 的移动或替换可显示不同的荧光探针图像。如选择不当, 也可能造成你观察到的结果并不是实验结果的真实再现。

(6) 如组织在探针应用后需要固定, 应选择那些能够耐受固定剂的荧光探针, 否则, 在固定过程中, 荧光将被洗脱。例如标准的葡聚糖不容易固定, 在固定过程中将被洗脱, 但葡聚糖赖氨酸固定的变型可有痕量的残留。

三、荧光探针到达后的保存

荧光团可能对空气、水、温度和 (或) 光线敏感, 一些以混合物形式运送的荧光团时间过长将发生降解 (如水解)。

(1) 注意维护你的所有荧光探针。在荧光探针到达后, 应注意填写其 MSDS 的化学名、生产 (供应) 商、商品目录号、分子量和储存条件等。

(2) 在订购荧光探针前确定荧光探针必需的储存条件, 最好能在冰箱内找到一个放置干燥器的空间。储存探针时首先应在容器周围包裹银箔, 但不要包绕帽部。留出一定的距离使得在打开容器时不必每次都打开银箔, 而且反复的打开和再包裹可造成银箔的损坏, 导致漏光。在容器上贴上白色标签, 写上荧光探针的名称和收到日期等内容。

(3) 不要机械地将所有荧光探针都在冰箱冷冻储存, 某些荧光探针和含有荧光探针的成分是不可冷冻的, 如荧光低密度脂蛋白 (LDL) 复合物和碱性磷酸酶标记的链亲和素等。

(4) 在荧光探针到达后, 要检查荧光探针的纯度, 尤其是向新的供应商订货时很有必要, 探针的纯度在不同的制造厂家间差别很大, 有时在同一厂家的不同批号间也存在差别。

四、将荧光探针制备成溶液

通常荧光探针的水溶液不稳定 (易引起水解作用), 其水溶液比其干品形式对光和热更为敏感, 通常最好是将吸水性的探针以干品保存, 在使用前再制备成溶液, 并将溶液避光保存。

(1) 处理和应用荧光探针时养成双手戴手套的习惯, 因为许多荧光探针是致突变剂或潜在的致突变剂 (可与核酸结合), 如 DAPI (4', 6-二氨基-2-苯基的吡啶) 和 PI (碘化丙啶), 因此处理时应特别注意。另外, 一些溶剂如 DMSO 可增加分子对皮肤和其他组织的穿透性。

(2) 应用新鲜配制的缓冲液, 陈旧的缓冲液其染色效果常常不佳。

(3) 对于某些化合物 (如某些肽类和蛋白质的盐类形式或某些核苷酸衍生物), 其确切的分子量不知道, 其浓度应在制备好溶液后加以确定。可通过测量其吸光度和使用激发系数来计算其浓度。使用 Beer 定律, $c=A/\epsilon b$, 此处 A 为吸光度 (无单位), ϵ 为吸光系数 (激发系数, 单位 $\text{cm}^{-1} \cdot \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), b 为光路长度 (1cm), c 为溶液浓度 (mol/L)。

(4) 可通过轻度改变 pH 值, 加入少量温和的去垢剂, 强烈机械搅拌使荧光探针变成水溶液。应用温和的碱性缓冲液, 如 0.1 mol/L 的碳酸氢盐改变 pH 值; 加入少量去垢剂 (如 Pluronic F-127, 一种非

离子去垢剂, 或 Triton X-100)。但应注意这些方法可降低染色效果, 也不主张在去垢剂溶液中长期保存。当然, 通过用吸管来回吹打、振荡器搅拌、超声乳化和中等度加热 (40℃~50℃) 也可制备荧光探针溶液。

(5) 将溶液抽真空 1~2min, 可除去溶液中的溶解氧。注意溶液要避光, 并且保证溶液能暴露于真空条件下 (如应松开容器的帽)。对于挥发性的溶剂不建议使用该方法。

(6) 检查荧光探针溶液是否存在不溶性颗粒。如果有不溶性颗粒, 可通过 12 000g, 离心 5 min, 而后用 Whatman 2# 滤纸过滤除去或将溶液经 0.22μm 微孔滤膜加压过滤。

(7) 离子探针的校准 (正) 液必须无重金属离子。重金属离子, 如锰, 将影响探针的亲力和荧光强度。金属螯合剂, 如钙离子螯合剂 TPEN, 有时可用来去除不想要的金属离子。应注意近来在缓冲液成分中发现大量的金属杂质, 应确保缓冲液盐类的高纯度或有效地去除了金属离子。

(8) 用于负载探针乙酰甲基酯 (AM) 形式的缓冲液应不含血清, 也不应含有任何初级或次级胺。因为血清中常含有酯酶和脂肪族的胺, 可裂解 AM 型酯化物, 影响探针的负载。

五、探针溶液的储存

(1) 脂溶性的探针常可在冷冻状态以浓缩的储存液形式安全保存很长时间, 常为 1~5mmol/L 的有机储存液。工作液可在使用前通过适当的缓冲液或溶液稀释储存液而制备, 常用浓度为 1~5μmol/L。因需要反复冻融探针母液来制备工作液, 这样增加了探针在空气和湿度中暴露的机会因此, 可将母液分装成若干等份后储存, 每次应用时融化快, 节省时间, 并可防止反复接触空气等不良因素。

(2) 应用时应让储存液完全融化, 不应只使用先融化的一部分, 而把余下的部分重新冻结。先融化的部分通常含有探针的浓度比仍处于冻结的部分高。溶液完全融化后, 应重新混匀, 并检查是否存在沉淀或聚集物 (如浑浊度)。在打开溶液前, 应让溶液复温到室温条件下。

(3) 蛋白质性探针 (如标记的抗体) 在储存过程中可产生聚集, 这些聚集物可引起非特异性染色。相似地, 某些探针在冷冻过程中还可发生沉淀, 如 PI, 这些聚集物可通过离心除去。用离心上清液染色, 可使非特异性染色得到控制。探针溶液复温到室温后应检查是否有沉淀存在, 如有沉淀存在, 可通过超声乳化、涡流混合重新溶解这些荧光染料。

(4) 许多探针的 AM 形式 (如 fluo-3、rhod-2) 非常容易水解。任何储存不当或储存期 6 个月以上的荧光探针溶液, 在使用前都应进行分解状况鉴定。确定荧光探针的 AM 形式是否水解, 可在比色杯中用的 DMSO 储存液稀释到 2~10μmol/L。在比色杯的缓冲液中含有 2.5μmol/L 钙测定液, 然后测定其荧光强度, 再将钙浓度增加到 5μmol/L 测定其荧光强度。因为只有荧光探针的水解形式可与钙结合, 如荧光强度增强, 提示可能出现了 AM 的水解。探针的酸性 (水解) 形式无法透过细胞膜进行扩散, 可购买这些探针的小包装, 并将这些探针适当保存。

(5) 应用前应检查探针的纯度。某些探针在储存过程中可发生分解, 例如标记的葡聚糖时间过长时, 将释放出少量游离染料, 如果释放的游离染料多, 在应用前必须进行再纯化。异硫氰酸盐如 FITC 也会发生变质。

(6) 如用闪烁瓶储存探针溶液, 注意某些染料可与帽里面的金属箔起反应, 还应注意某些染料与玻璃比与塑料的结合更容易, 因此玻璃储存容器对探针溶液的储存, 并非总是最好的。对于分子探针公司的 SYBR Green, 则推荐使用 Rubbermaid Servin' Saver 的夹层盒。

六、做好背底检查

在应用 LSCM 时, 造成人工假象的一个重要因素可能是自发荧光, 它使图像的信/噪比降低。生物学自发荧光通常是由激发波长短于 500nm 的光线引起的, 然而, 某些标本 (如含有大量叶绿素或卟啉的标本) 在红外光照射下将产生荧光。自发荧光的性质和程度也依赖于标本制备的情况。

(1) 避免用乙醛固定, 尤其是使用戊二醛固定时, 标本将产生自发荧光, 用苦味酸和过碘酸盐也会产生自发荧光。假如必须乙醛固定, 在染色前, 用 0.1% 的氢硼化钠 (用 pH 8.0 的 PBS 配制) 洗涤 30min 可降低自发荧光。

(2) 通过仔细选择滤过截留物 (cutoff) 或选用长波长探针, 可减低或去除自发荧光。缩窄通带 (bandpass) 可降低探测的荧光强度, 使用远红区 (high-red) 荧光团更好。但应注意, 长波长的使用可影响分辨率并引起光学反应。

(3) 在图像采集前尽可能多地减低或去除来自于游离的或非特异性结合的荧光探针 (“试剂背底”) 产生的荧光信号。如, 由于 fluo-3 (或其他的荧光团衍生物) 的泄漏造成的 “试剂背底” 可通过向其外部培养液中加入抗荧光团的抗体消除。在图像采集前, 应该用适当的缓冲液 (如溶解探针的溶液) 冲洗细胞或组织, 可洗去与样品结合不紧密或非特异性结合的探针。

(4) 当应用比率探针 (ratiometric probe) 时, 为计算在任何点上的比率, 必须进行背底荧光校正。

(5) 在所有的准备步骤后, 都应检测标本的自发荧光。如前所述, 固定可引起自发荧光, 加热、加入某些缓冲液、固定时间过长和许多其他因素等也可引起自发荧光。

七、标记

主要讨论 LSCM 所使用荧光探针的注意事项。

(1) 反复实验确定用于探针负载的最佳温度、孵育时间和探针浓度。无论如何, 应尽量使用较少的荧光染料, 并在室温下进行负载 (而不是在样品的最佳的生理温度), 如离子探针的葡聚糖交联物较少发生区室化或渗漏, 应通过侵入性方法负载入细胞。抗体标记物的合适浓度应通过实验确定, 在大多数情况下, 浓度在 5~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间。

(2) 离子探针应在介质中进行校正, 那些介质与实验所用的介质非常类似, 进行原位 (穿透细胞) 校正通常是最好的方式。对于 SNARF-1 (一种 pH 测定的比率探针), 可通过使用离子载体或其他穿透剂使细胞内和已知外部培养基的 pH 达到平衡, 进行原位校正。用于穿透细胞的试剂包括 A-23187、ionomycin、尼日利亚菌素、洋地黄皂苷和皂角 (素) 苷。

(3) 当应用离子探针的 AM 酯形式时 (如 BCECF、fluo-3、rhod-2), 应检查探针的区室化 (compartmentalization) 现象。离子探针常以 AM 酯形式负载入细胞, 进入细胞后被胞浆内的酯酶裂解形成荧光指示剂, BCECF [2',7'-双-(2-羧乙基)-5-(6)-羧基荧光黄] 就是以这种方式进行的。如果 AM 酯易位 (translocate) 至细胞内小区, 仍可转化为荧光形式, 然而这种幽避指示剂 (sequestered indicator) 对胞浆内离子水平的变化不再有反应。

(4) 增加离子探针的浓度可对离子进行缓冲并干扰细胞的功能。在特定系统中探针负载的 “剂量依赖” 曲线可用来确定最大允许负载浓度, 典型的探针细胞内浓度范围在 30~100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。

(5) 在应用前应确保探针完全混合/溶解在探针的工作液中, 将非挥发性的探针溶液抽真空 1~2min 除去溶解氧, 并检查是否存在不溶性颗粒。

(6) 常规的细胞或组织染色对荧光探针的染色有影响, 有时可使荧光淬灭。

(7) 在染料负载后, 用缓冲液洗涤标本, 将与细胞膜非特异性结合的染料洗去。

(8) 最后, 还应记住探针可能以意外的方式参与细胞的生化反应。例如罗丹明 123 是一种 P 糖蛋白底物。

八、荧光信号的检测

(1) 应注意采用最小的激光强度来激发。

(2) 采集图像时, 不要使激发强度饱和, 也应不要在探测阈值之下。尽管在图像采集后, 仍可进行反差调节使某些特定的结构更容易看到, 但图像的信息量是相同的, 相似地, 超过饱和状态的情况下,

无论其真实的信号强度多强,总是被记录为最大的像素值(即 255)。

(3) 增加标记物的量(即加入更多的探针,但注意应在淬灭浓度之下)可使检测的荧光强度增强,但注意并不呈线性关系。

(4) 不要用过强的照明强度过度激发探针。在点扫描共聚焦显微镜激光强度过强可能很容易引起探针的激发饱和,尤其是具有长衰减时间的荧光探针,如嵌二萘(pyrene)。检测的荧光强度与荧光探针的浓度不再呈函数关系,信/噪比降低。照明强度的增强也引起光漂白的加快。

(5) 使用多种荧光探针时,应避免荧光从较低的通道向较高通道的渗透。如渗透不能避免,应确定其发生的位置(即在较高通道中检测到的由较低通道荧光探针所标记的结构),假如可能,在同一部位也使用较低的波长采集第一幅图像,再用较长的波长采集第二幅图像,最后使用两种波长采集第三幅图像。将第一幅和第二幅图像合并,而后与第三幅图像比较,这样可以确定渗透发生的部位。

(6) 当使用两种或多种荧光探针进行荧光双标或多标时,较短波长荧光探针的发射光谱与较长波长荧光探针的激发光谱重叠,则可发生荧光共振能量传递(fluorescence resonant energy transfer, FRET)。如果荧光探针光谱足够靠近的话(根据荧光探针光谱特征不同,范围在 10~100Å 之间),较短波长荧光探针的激发态可与邻近的较长波长探针的基态偶合并激发它。换言之,较短波长荧光探针激发的波长,却是较长波长荧光探针的发射波长。

(7) 要注意残留的未标记探针和造成人工假象的荧光碎片存在的可能性。高强度的照射和细胞酯酶可引起某些探针裂解,裂解产物本身可产生荧光。如线粒体染色所用的罗丹明 B 己烷基酯,可用绿色波长的光激发,最大发射波长为 578nm,它可被激发光裂解,裂解产物也可发出荧光,其波长范围在荧光黄的波长范围内。

(8) 不要混淆检测和分辨率。分辨率受到激发光线波长的限制,例如即使是 200nm 的脂质体,用可见光也无法分辨,然而只要其荧光发射强度足够就能被检测到。类似地,肉眼在夜晚可发现星星,但却不能分辨星轮(stellar disk),它们看起来来源于同一点。对于脂质体来说,就是无法将完整的脂质体与其标记的片段分开,但却可以检测到。

九、光漂白

如果增加每一像素的激发强度和(或)采集时间,全部荧光信号(图像的亮度)可增强。但在实际应用中,光化学反应(包括光漂白)的存在,使标本受光照射的量受到限制。光漂白是由于受到光线的过长时间的照射而引起荧光的不可复性破坏,可能与分子氧的存在有关。

(1) 开始图像采集前,在标本的非关键部位检查光漂白的速率;在采集关键的图像前,调整好激光的强度和增益。

(2) 在固定标本过程中使用抗氧化剂或荧光抗衰减剂。尽管这不是唯一的好的光保护剂,但对于 LSCM 来说,用 10%PBS 配制的 0.1% *p*-苯二胺(PDA)和用缓冲液配制的 90%的甘油是良好的抗衰减剂。*p*-苯二胺有致癌性,应用时应特别注意防护。对于活体标本,抗氧化剂如维生素 C (0.1~1.0mg/mL 或更高浓度)可作为还原剂在培养液中使用。但也应注意,最初的标记和衬染可能影响抗衰减剂的性能。

(3) 活体标本制备过程中,为使光漂白作用降到最低,在能够耐受的情况下应降低氧分压或氧浓度。例如,可在培养液中通入氮气或氩气,在培养液中加入耗竭氧的酶(如 Oxyrase, Oxyrase Inc. PO Box 1345, Mansfield, OH 44901)也有一定作用。

(4) 在某些共聚焦显微镜,软件的放大("zoom"增大)可使光漂白速率增加。假如扫描更小范围(更大的 zoom 值)和扫描整幅图像(zoom=0)所用的时间相同,则较小的图像单位区域内受到的光照强度(分配的总能量)比整幅图像单位区域内受到的光照强度要高,因此在 zoom 值增大(即受照范围缩小)时,更容易产生光漂白。避免产生这种现象的一种方法是先在 zoom 为零的情况下,采集整幅图像,而后再对此数字图像进行放大。

(5) 在较厚的标本进行 Z 扫描图像采集时, 据认为荧光探针的分布可能多少有些不均匀, 其荧光强度随距标本表面的距离迅速下降, 因此考虑沿“反方向”进行图像采集, 即先采集最大深度(离标本表面最远)的图像, 而后再依次向标本表面移动采集。点扫描 LSCM 时在整个标本都可发生光漂白, 而不是仅仅发生在图像采集的光学切面上。假如从标本的顶(上)部开始采集, 最深处的标本切面可能在图像采集前就已发生光漂白, 而无法得到相应的图像。应从深处开始采集, 而后逐步移向表面, 因为最表面的切面, 其荧光标记强度也较强, 可经受较长时间的光照, 对光漂白有一定耐受作用。

(6) 根据光毒性确定应用哪种荧光探针。如长波长钙离子指示剂 calcium green-1 比 fluo-3 的光毒性小。

十、环境影响因素

探针的环境对荧光有强烈影响, 例如溶剂的极性(包括任何膜或膜包结构的内部和分子内部的区域)、pH 和荧光淬灭物质的存在(包括荧光探针本身)。淬灭是分子的相互作用引起的光量子产生量的降低。

(1) 许多探针的发射光谱依赖溶剂的极性。在某些情况下, 探针在水中完全无荧光。尼罗河红(nile red)、ethidium homodimer(乙啶同二聚体)、碳花青、NBD、PI、EB 和 DPH(二苯基己三烯)对极性高度敏感。在水溶液中, 其光量子产生量低, 当它们进入疏水环境与水隔绝或与活性分子结合后, 其荧光强度大大增强。

(2) 某些探针的激发和发射光谱依赖于溶剂的极性, 如尼罗河红。

(3) 为获得最大的荧光强度, 固定标本用 pH 敏感的探针进行染色, 如使用荧光黄和某些荧光黄衍生物时, 应用适当 pH 值的水溶性介质封片, 对于荧光黄其 pH 值为 8 或 8 以上。荧光黄的 pKa 约为 6.4, 当其介质变为酸性时, 其荧光发射急剧下降, 几乎其所有衍生物都显示一定的 pH 敏感性。

(4) 对于储存时间过长的探针溶液或培养液, 不能想当然认为其 pH 保持不变, 而应进行测试。如在冷冻后 Tris 缓冲液的 pH 增加。在室温下制备的 pH8.0 的缓冲液, 在 4℃ 时, 其 pH 值会增加到 8.5。

(5) 探针溶液和培养液的 pH 影响染色效果、探针的稳定性和荧光的发射强度。

(6) 带有芳香族氨基酸残基的蛋白质可使某些荧光团的荧光淬灭, 特别是荧光黄和 NBD [7-硝基亚苄基-2-氧(oxa)-1,3-重氮]。这种影响在某些情况下可部分消除, 如在进行生物素化抗体标记结束后, 用荧光黄标记的卵白素与生物素结合, 可使荧光强度大大增强。

(7) 当荧光探针的浓度太高时, 可发生自我淬灭或浓度淬灭。当多种荧光探针标记同一部分时也会发生淬灭。对于荧光黄来说, 每一抗体分子可结合 2~4 个荧光团。

十一、仪器因素

仪器本身的因素也可影响信噪比、分辨率、图像的整体质量。以下对某些因素进行讨论:

(1) 使用折射指数与要观察的标本折光指数相近的封片液封片, 否则图像的质量将因折光指数不相配而受到严重影响。如用水浸镜采集含水(活)的标本图像时, 使用了观察固定组织的镜油封片。折光指数的相配对于提高分辨率十分关键。

(2) 使用低放大倍数和高数值孔径(NA)的物镜, 采用软件放大(即在 Bio-Rad 公司的 LSCM 中增大“zoom”值)而不是通过采用更高倍数和相应 NA 的物镜。采集的光线强度随着 NA 的平方而增加, 随着放大倍数的平方而降低。一个 60 倍, NA 为 1.4 (60×/1.4) 的物镜比 100×/1.4 的物镜更可取。高放大倍数的物镜主要是由于光线要穿过大量的光学元件, 因此得到的图像也更“暗”。

(3) 将显微镜的光学部分和探测器校正以适应要检测的荧光探针。UV 探针需要 UV 物镜和 UV 反射镜。许多老的系统使用对远红外区(high red)敏感性差的光电倍增管(PMT), 其光学部分不能阻断或足够地修正远红波长。

(4) 共聚焦滤光片应与使用的荧光探针相配。理想的发射滤片的带宽 80%~90% 应处于荧光探针发

射光谱的范围内。

(5) 检查所使用的所有光学系统校正情况, 所有与成像有关的因素(物镜、滤光片等)都应使用得当。对于双标或三标图像, 应用荧光微球在合适的波长进行检测是一种方便的方法, 可检查各通道的情况。简单地说, 就是将来自于不同通道的图像进行重叠, 观察它们是否可准确叠加。这部分内容在荧光探针和研究用化学物手册(*Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*)有详细描述。

(6) 如果存在出乎意料的模糊或无图像, 应沿着样品光路逐步检查, 寻找引起故障的可能机械原因。一般检查包括物镜的内光阑、光阑和(或)缝隙是否部分或全部关闭、光路中是否存在阻断光线的滤光片等。

(7) 用常规方式激发时, 如寻找感兴趣的结构, 可能出现红色的标记较暗的情况。人视觉的最高上限约为 750~770nm, 视网膜对 650nm 以上光线的敏感性较差。由某些远红外荧光团(如花青类 Cy5 等)发射的荧光的大部分是肉眼看不见的, 换句话说, 在某些情况下, 用肉眼通过普通荧光显微镜对荧光强度进行准确评价是不可能的。然而, 大多数 LSCM 能检测的红色范围远比人眼要广泛得多。

(8) 在标本制备和观察的过程中, 避免漫不经心的沾染荧光性物质。加拿大香脂、不同种类的透明指甲抛光剂、某些环氧树脂和某些用于防止锋利工具(如剃刀)锈蚀的机油都有荧光。

十二、以 FITC 作为 LSCM 探针的例子

FITC 是一种应用最为广泛的用于制备标记物的荧光探针。根据以上的指标进行评价如下:

其主要优点是光量子产生量高, 良好的光吸收作用和荧光强度高。在交联后, 其发射光谱不发生显著偏移, 具备良好的水溶性, 非特异性结合低, 其最大激发波长为 490nm, 与氩离子激光的波长 488nm 非常接近; 其化学性质研究充分, 其使用的许多操作步骤都可在文献中找到; 使用标准的共聚焦显微镜滤光片可获得良好的检测效果。

然而, 其不足之处也非常明显: 荧光对 pH 和极性溶剂敏感; 其发射光谱与生物学自发荧光的波长范围重叠; 可迅速地发生光漂白; 在交联后易引起荧光淬灭; 其发射光谱的尾部非常长, 在多标记实验时, 容易渗透至较长波长的通道。

FITC 在 LSCM 是一种有用的荧光探针, 但研究者应知道这些局限的重要性。

第四节 使用花青类染料进行 LSCM 荧光双标记

乙酰胆碱是重要的神经递质, 乙酰胆碱受体是神经递质门控的离子通道。研究受体的方式很多, 应用 LSCM 研究突触相关部位的神经细胞表面乙酰胆碱受体的定位是一种特别有用的方法。LSCM 可产生高分辨率图像, 通过标记不同的荧光探针, 可准确反映不同荧光标记物的定位。但是, 当二抗用 FITC 标记的山羊抗大鼠 IgG 和 TRITC 标记的山羊抗小鼠 IgG 时, 遇到的问题是当用 488nm 的氩-氩激光激发时, 不仅可激发 FITC, 也可激发神经节细胞胞体内的自发荧光颗粒, 因此这些颗粒在 FITC (绿色) 和 TRITC (橘红色) 通道都可检测到发射的荧光。这些细胞内自发荧光颗粒的存在, 对于在重建神经细胞上观察受体分布和使用图像分析软件分析受体簇的大小和强度带来一定难度。因此必须寻找新的方法, 既可显示受体和突触扣结, 又不会激发自发荧光颗粒。自发荧光颗粒不能被 568nm 和 647nm 的氩-氩激光有效激发, 因此采用能被以上波长有效激发的荧光探针将会对乙酰胆碱受体的研究起到积极作用。已知花青 3.18 (Cy3) 和花青 5.18 (Cy5) 是可被两种波长有效激发的荧光探针, 而且已被成功用于氩-氩激光 LSCM, 进行荧光三标研究。

使用 Bio-Rad MRC-1024 型 LSCM, 配备氩-氩激光器, 可同时定位乙酰胆碱受体和突触终末(突触扣结)。采用青蛙心脏神经节, 用大鼠抗乙酰胆碱受体抗体鉴别乙酰胆碱受体, 用小鼠抗突触小泡糖蛋白 SV₂ 显示突触扣结。二抗分别为 Cy3 标记的山羊抗大鼠 IgG 和 Cy5 标记的山羊抗小鼠 IgG。

用 REFL 滤片组, 通过调节 PMT 的增益可将 Cy5 中 Cy3 的渗透调低到 2%, 即 Cy3 通道中来源于 Cy3 的灰度值为 200 像素, Cy5 通道中来源于 Cy3 的灰度值为 4 像素。这比 FITC 渗透至红色通道的显著减低, 当用 Bio-Rad 提供的 K1/K2 滤片组时, FITC 在红色通道的渗透值为 12%。与传统的使用 K1/K2 滤片组进行蓝-率双标比较, 用 C1/C2 滤片组 (现在称为高级三标组合) 进行 Cy3-Cy5 双标的另一个优点是其他常用的荧光染料 (包括 FITC、TRITC、丽丝胺罗丹明和 Texas Red) 更加明亮。Cy5 的缺点是其发射光谱为远红外区域, 肉眼很难看到, 因此在普通荧光显微镜应用时一般难以观察。但是, MRC-1024 LSCM 配备的 PMT 可很好检测远红外光线。应当注意, Cy5 如用水溶性封片液时, 其光漂白非常快, 通过在封片液中加入 2%~4% *n*-丙基胍硝酸盐可显著延缓 Cy5 的光漂白作用。据报道, Cy5 在非水溶性介质 (如冬绿树油) 中, 不发生迅速光漂白作用。Cy5 的超长亮度提示仅仅使用 568nm 的光线激发, 我们就可以看到。568nm 对 Cy5 的激发效率是 11%, 而 647nm 波长的激发效率为 98%。由此可见, 其激发效率可有 10 倍左右的降低, 这样可以保证对 Cy5 标记的样品进行重复扫描而不会产生太大的荧光信号损失。为补偿激发效率的损失, 可通过将 PMT 的增益增加到 6~7 (其范围是 0~10)。用 Cy3/Cy5, 可对青蛙心脏神经节、鸡睫状神经结和鸡脑干进行双标记。双标记结果表明, 受体存在的部位与突触扣结部位密切相关。

双标记结果表明: 用 Cy3/Cy5 进行双标比传统的应用 FITC/TRITC 双标有明显的优点, 用 Bio-Rad 公司生产的滤片组很容易实现。

第二十五章 常用组织学技术

第一节 免疫荧光组织化学细胞和组织标本的制备

免疫荧光组织(细胞)化学技术是采用荧光素标记抗体来检测细胞和组织内的相应抗原。抗原的准确显示和定位与制备的细胞和组织标本质量的好坏有着密切的联系。由于各种抗原的生化、物理性质不同,如温度高低、酸碱度强弱及各种化学试剂的作用均可影响抗原的免疫学活性,良好的细胞和组织学结构将有助于抗原的准确定位。因此,细胞和组织标本的采集制备在免疫荧光组织化学技术中占有十分重要的位置。

一、细胞标本的取材

目前,免疫荧光组化技术已经应用于细胞学诊断,如鉴别低分化癌与恶性淋巴瘤、黑色素瘤、低分化肉瘤等。近年来,随着激光扫描共聚焦显微镜的应用和逐步普及,免疫荧光组织化学技术发挥越来越重要的作用。而在共聚焦激光扫描显微镜中,采用培养细胞进行研究是常用的手段,因此对细胞标本的取材也提出了相应的要求。细胞标本的取材有以下三种方法:

1. 印片法 主要应用于活组织检查标本和手术切除标本。新鲜标本以最大面积剖开,充分暴露病变区,将载玻片轻轻压于病变区,脱落的细胞便粘附在玻片上,立即浸入细胞固定液内 5~10min,取出后自然干燥,低温保存备用。

该方法优点是简便省时,细胞抗原保存较好;缺点是细胞分布不均匀,玻片上细胞重叠,影响标记效果。

2. 穿刺液涂片法 主要应用于实质器官的病变区,如肝、肾、肺、淋巴结、软组织等。用细针穿刺吸取病变区内液体成分,如穿刺液较少,可直接涂抹在载玻片上,力求细胞分布均匀。如穿刺液较多,细胞丰富,可用洗涤法:将穿刺液滴入盛有 1~2ml Hanks 液(或 RPMI 1640 液)的试管内,轻轻搅拌,以 500rpm 低速离心 5~10min 后,弃上清液,将沉淀制成细胞悬液(浓度约 2×10^6 个细胞/ml),吸取 1 滴滴于载玻片上,轻轻涂抹,待涂片略干即可固定。

直接涂片法优点是操作简便,细胞形态保持较好;缺点是细胞分布不均匀。

3. 体液沉淀涂片法 主要用于胸水、腹水、尿液、脑脊液等体液多、细胞少的标本。体液采取后,必须及时处理,但不宜加固定液。根据标本内细胞数量的多少选用不同的处理方法:①细胞数量极多者,可吸取少量液体直接涂在玻片上;②细胞数量较少者,可将液体自然沉淀,然后吸取 5ml 左右沉淀液,以 1500rpm 离心 10min,弃上清液,将沉淀涂片,略干后固定备用。

如用细胞离心涂片器(Cytospin),可将标本用上述离心沉淀法制成 2×10^6 细胞/ml 的细胞悬液,吸取 50 μ l 加入涂片器内,离心后即制成分布均匀的细胞涂片,细胞分布在直径约 6mm 的小圆圈内,每个圆圈内的细胞数约 10^5 个。

培养细胞标本的取材可根据培养的细胞特性分别采取不同的方法。某些细胞有贴壁生长的特性,如成纤维细胞、粘液癌细胞等,只需将载玻片或盖玻片插入培养液内即可收集到理想的细胞标本;某些细胞只能在培养液中生长,可用上述体液沉淀离心涂片法处理。

制备细胞涂片应注意:①标本反复离心洗涤会造成细胞的粘附性降低,在免疫组化染色过程中容易

脱片,因此在制备涂片前载玻片上应涂粘附剂;②为节省试剂和便于镜下观察和记数,应将细胞集中到直径0.6~1.0cm的圆圈内,细胞总数以 10^5 个左右为宜;③粘液丰富的标本如痰液、胃液等,未经特殊处理,一般不宜作免疫组化标记。

二、组织标本的取材

组织标本主要包括活检标本、手术切除标本、动物模型标本以及尸体解剖标本等。前三者均为新鲜组织,后者是机体死亡2h以上的组织,可能有不同程度的自溶,其抗原可能有变性消失、严重弥散现象,因此,尸检组织应尽快固定处理,以免影响免疫组化标记效果。但有些较稳定性抗原,如HBsAg、HBcAg等在尸检标本中,抗原显示仍较好。

组织标本的取材常常受到各种因素的影响,如各种内窥镜钳取的组织,常因过度挤压而变形,严重者组织结构被破坏。大组织标本病变分布广泛,抗原在组织中分布不均一,常出现人为的组织取材不准确。为了避免上述缺点,组织取材时应注意:①活检钳的刃口必须锋利,以免组织受挤压;②取材部位必须是主要病变区;③必须取病灶与正常组织交界区;④必要时取远距病灶区的正常组织作对照。为充分保存组织的抗原性,标本离体后应立即作处理,或立即速冻成冻块进行冰冻切片,或立即用固定液固定进行脱水、浸蜡、包埋、石蜡切片。如不能迅速制片,可贮存于液氮罐内或-70℃冰箱内备用。

第二节 细胞和组织的固定

一、固定的目的

不同抗原,其稳定性也不相同,因而对固定剂的耐受性差异较大。如T淋巴细胞表面抗原属不稳定性抗原,对固定剂的耐受较差,抗原活性容易丧失;而HBsAg属稳定性抗原,其抗原活性很少受固定剂种类、固定时间、温度等因素的影响。若想得到理想的免疫组化染色结果、正确地判断抗原物质在组织细胞内的位置,除需有良好酶和抗体外,保持组织细胞内抗原物质的原位不动和免疫活性也是至关重要的。如果抗原物质在组织细胞间弥散、丢失或失去免疫活性,无论如何努力染色效果都不会很好,所以说固定是免疫组化染色中非常重要的一环。免疫组化与其他组织学技术不同,除要求保存良好的结构外,还需保存组织抗原的免疫活性。一般认为,新鲜组织能够最大限度地保存组织抗原的免疫活性,但结构较差,易出现抗原弥散丢失现象。据报道不固定的组织切片免疫组化染色时,环鸟苷酸含量丢失80%以上。固定的目的是使构成组织细胞成分的蛋白等物质不溶于水和有机溶剂,并迅速使组织细胞中各种酶降解、失活,防止组织自溶和抗原弥散,保持组织细胞的完整性和所要检测物质的抗原性。因此迅速充分固定是免疫组化染色成功的关键一步。用于免疫组化的固定剂种类较多,选择时应根据所要检测物质的抗原性质和切片方法以及所用抗体特征等做最佳筛选。

二、固定剂

用于免疫组织化学的固定剂种类较多,性能各异,在固定半稳定性抗原时,尤其重视固定剂的选择,简介如下,其他固定剂及其配制方法可参阅相关文献。

(一) 醛类固定剂

双功能交联剂,其作用是使组织之间相互交联,保存抗原于原位,其特点是对组织穿透性强,收缩性小。有人认为它对IgM、IgA、J链、 κ 链和 λ 链的标记效果良好,背景清晰,是常用的固定剂。

1. 10%钙-甲醛液 配方:浓甲醛10ml,饱和碳酸钙90ml。
2. 10%中性缓冲甲醛液 配方:浓甲醛10ml,0.01mol/L pH7.4 PBS 90ml。
3. 4%多聚甲醛磷酸缓冲液(pH7.4) 配方:多聚甲醛40g,0.1mol/L的PBS液(pH7.4)500ml,

两者混合加热至 60℃, 搅拌并滴加 1mol/L NaOH 至清晰为止, 冷却后加 PBS 液至总量 1 000ml。

4. 戊二醛-甲醛液 配方: 戊二醛 1ml, 浓甲醛 10ml, 蒸馏水加至 100ml。

戊二醛是二醛基化合物, 交联结合力比甲醛大, Bullock 认为交联过强, 可出现组织改变和空间遮蔽现象, 影响组织的抗原性; 但 McDonald 等认为, 该试剂用于 PAP 法免疫酶标记效果仍满意。

5. 甲醛升汞固定液 (B5 固定液) 配方: 浓甲醛 10ml, 氯化汞 6g, 醋酸钠 1.25g, 蒸馏水 90ml。

有人认为此固定液悬液是较理想的固定液, 标记 IgA、IgM、IgG 等抗原效果良好; 也有人认为它减弱细胞的抗原性, 上皮细胞可产生非特异性荧光, 故不宜用于免疫荧光标记。氯化汞是一种强蛋白凝固剂, 但对组织穿透性弱, 且使组织收缩, 故与甲醛混合使用。

6. 醋酸-甲醛液 配方: 浓甲醛 10ml, 冰醋酸 3ml, 生理盐水加至 100ml。

Bullock 等认为此液固定效果良好, 组织可不经消化, 胞浆 IgA、IgG、IgM、IgD 和 κ 、 λ 、J 链标记均呈阳性, 且背景染色极淡。如标记 IgG 用 PAP 法第一抗体仅为甲醛升汞液的 1/10。此液内的醋酸既可防止组织收缩, 又可暴露胞浆免疫球蛋白抗原决定簇。

7. Bouin 液 该固定液为组织学、病理学常用固定剂之一, 对组织穿透力较强而收缩性较小, 比单独醛类固定更适合免疫组化染色。Kayhko 认为用于标记 B 细胞的 J 链较好, 但 Bullock 则认为它可导致 IgG γ 重链变性, 故必须加大第一抗体的浓度。

8. Zamboni 液 该固定液可用于电镜免疫细胞化学, 对超微结构的保存优于纯甲醛, 也适用于光镜免疫细胞化学研究。采用 2.5% 多聚甲醛和 30% 饱和苦味酸, 更可增加对组织穿透力和固定效果, 以保存更多的组织抗原。固定时间为 6~18h。

9. PLP 液 (过碘酸盐-赖氨酸-多聚甲醛固定液) 该固定剂适用于富含糖类的组织, 对超微结构及许多抗原的抗原性保存较好。其机制是过碘酸氧化组织中的糖类形成醛基, 通过赖氨酸的双价氧基与醛基结合, 从而与糖形成交联。组织抗原大多数是由蛋白质和糖两部分构成, 抗原决定簇位于蛋白部分, 故该固定液有选择性地使糖类固定, 既稳定, 又不影响其在组织中的位置 (固定剂 7~9 配制法见附录二)。

(二) 非醛类固定剂

Pe 等人比较几种非醛类双功能试剂指出, 碳化二亚胺、二甲基乙酰胺、二甲基辛酰亚胺、和对苯醌等均适用于多肽类激素的组织固定, 单独使用时, 边缘固定效应重, 但与戊二醛或多聚甲醛混合使用, 效果明显改善。

1. 碳化二亚胺 (1-ethyl-3 (3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide-HCl) 液 2g 溶于 100ml 0.01mol/L, pH7.4 PBS 中。此液宜用于标记多肽类激素的组织, 对标记 IgA、IgG 效果不佳。

2. 碳二亚胺-戊二醛液 (ECD-G 液) 配制法见附录二。ECD-[1-ethyl-3 (3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide Hydrochloride], 即乙基-二甲基氨基丙基碳亚胺盐酸盐, 简称乙基-CDI。该液常用于多肽类激素的固定, 对酶等蛋白质固定效果良好, 对细胞内抗原定位, 超微结构保存好, 是一种进行培养细胞电镜免疫细胞化学研究的良好固定剂。

3. Zenker 液 配方: 重铬酸钾 2.5g, 氯化汞 5g, 硫酸钠 1g, 蒸馏水 100ml, 混合溶解后, 临用时加冰醋酸 5ml。

该固定液对免疫球蛋白染色最佳, 固定时间约 2~4h, 染色前必须脱汞色素。

(三) 丙酮及醇类固定剂

系最初免疫细胞化学染色的固定剂, 其作用是沉淀蛋白质和糖, 对组织穿透性很强, 保存抗原的免疫活性较好。但醇类对低分子蛋白质、多肽及胞浆内蛋白质保存效果较差, 解决的办法是和其他试剂混合使用, 如加冰醋酸、乙醚、氯仿、甲醛等。

1. Clarke 氏改良剂 配方: 100% 酒精 95ml, 冰醋酸 5ml, 用于冰冻切片的后固定。

2. 乙醚 (或氯仿) 与乙醇等量混合液 其组织穿透性极强, 即使涂片上富于过多的粘液, 固定效果仍然良好, 是理想的细胞固定液。

3. AAF 液 95%~100%酒精 85ml, 冰醋酸 5ml, 浓甲醛 10ml。

4. Carnoy 液 配方: 100%酒精 60ml, 氯仿 30ml, 冰醋酸 10ml, 混合后 4℃保存备用。

5. Methacarn 液 配方: 甲醇 60ml, 氯仿 30ml, 冰醋酸 10ml, 混合后 4℃保存备用。

以上两种固定液适宜某些抗原、癌基因蛋白产物检测的固定, P53 抗癌基因蛋白产物、PC-NA 等抗原的保存。

丙酮的组织穿透性和脱水性更强, 常用于冰冻切片及细胞涂片的后固定, 保存抗原性较好, 平时 4℃低温保存备用, 临用时只需将涂片或冰冻切片插入冷丙酮内 5~10min, 取出后自然干燥, 贮存于低温冰箱备用。

以上介绍了免疫组织化学中常用的固定液, 用于免疫组化的固定剂种类很多 (见附录二), 不同的抗原和标本需经过反复试验, 选用最佳固定液。不少学者认为, 迄今尚无一种标准固定液可以用于各种不同的抗原固定。而且同一固定液固定的组织, 免疫组化染色标记结果可截然不同, 致使人们无所适从。选择最佳固定液标准是: ①最好地保持细胞和组织的形态结构。②最大限度地保存抗原的免疫活性。一些含重金属的固定液在免疫组化技术中是禁用的。实际经验告诉我们, 中性缓冲甲醛液 (或多聚甲醛) 是适应性较广泛的固定液, 但固定时间不宜过长。必要时, 可作多种固定液对比, 从而选出理想的标准固定液。

固定组织时应注意: ①应力求保持组织新鲜, 勿使其干燥, 尽快固定处理; ②组织块不宜过大过厚, 必须小于 2cm×1.5cm×0.3cm, 尤其是组织块厚度必须控制在 0.3cm 以内; ③固定液必须有足够的量, 在体积上一般大于组织 20 倍以上, 否则组织中心固定不良影响效果; ④组织固定后应充分水洗, 去除固定液造成的人为假象。

三、固定方法

1. 浸入法 (immersion method) 将组织浸泡在固定液内, 必要时可在低温 (4℃) 环境下进行, 固定时间可根据抗原的稳定性以及固定液性质而定, 一般在 2~12h 之间。

2. 灌注法 (perfusion method) 此法适用于动物实验研究。自左心室插入主动脉, 先以 Krebs 或生理盐水冲洗血液后, 以泵、吊筒或 50~100ml 注射器注入固定液。置灌注动物于 4℃冰箱内, 次日取出脑组织或其他组织。外周组织一般在灌注后 30 min 内取材, 取组织置同一固定剂中浸入 1~3h, 然后修整组织块。一般光镜下观察的标本, 室温固定和冷固定剂 (4℃) 进行灌注都可获得满意效果。但应注意保持组织新鲜很重要, 据报告, 肽类抗原活性在断绝血液供应后 24h 几乎完全丧失。灌注法固定可使固定液迅速达到全身各组织, 达到充分固定的目的。灌注冲洗还能排除红细胞内假过氧化物酶的干扰。浸入法主要用于活检和手术标本, 以及其他不能进行灌注的组织固定。

3. AMEX (acetone meth enzoate xylene) 此法是改良的冰冻置换法 (freeze substitution) 的简称, 主要用于石蜡包埋标本。Sato (1986) 报道, 该法具有同新鲜 (未固定) 组织冰冻切片同样的抗原保持性和石蜡切片的良好组织结构保存。其机制为: 组织在丙酮中固定 (脱水), 组织细胞内水分逐渐被丙酮取代, 继之用苯甲酸酯取代组织内丙酮, 经二甲苯置换后石蜡包埋。组织在 -20℃丙酮内过夜亦形成冰晶, 所以原方法将组织先置 4℃丙酮 20~30min, 再移入 -20℃丙酮过夜, 实际上组织在 4℃丙酮内过夜亦可得到同样效果。如在该固定液内加入少量蛋白酶活性阻断剂, 并采用低熔点石蜡包埋等, 可获得更佳染色结果。

4. 微波固定 (microwave fixation) 是近几年备受关注的课题之一。该方法能保持良好的组织结构和抗原性, 适于各种切片的酶组化、免疫组织化学, 以及免疫电镜等材料固定。其固定机制可能与微波 (频率 1 000~3 000MHz) 具有被水分吸收的性质 (通常所用的微波是频率 2 450MHz, 波长 12cm); 生物材料含有大量水分, 照射后, 温度升高、分子运动加快、促进固定液向组织内渗透、加速与组织成分的反应、短时间内达到固定的效果等有关。经微波照射固定的组织, 需置相同固定液中, 继续室温固定

2~6h。专门用于微波固定的微波炉已商品化,例如:Bio-Rad H2500型、日新EM-MWE-2等,该类微波炉能够准确地调节照射时间和测定被照材料的瞬时温度。利用家用微波炉代替时,应选用能以秒为单位调控的微波炉。实验材料不同,所需固定液的量、照射时间等各异,所以应在预实验的基础上,找出合适的固定液量、照射时间和温度。多数实验室的条件为:固定液5~10ml,照射10~30s,照射后固定液的温度 $\leq 50^{\circ}\text{C}$ 。其方法为:将实验标本置于微波炉旋转台的中央,周边放一烧杯盛300~500ml纯水,吸收照射时炉内产生的热量,选择强档照射10~30s。接通电源至微波产生,利用超声波代替微波照射或二者并用,照射后,组织标本和固定液的温度升高较少,亦能获得短时间内良好的固定效果。微波炉照射的切片,能够激活部分核内抗原活性。其机制不清,可能与高温、高热作用使核内DNA双链解开,DNA、RNA解离,抗原暴露有关。其步骤为:将切片脱蜡水洗后,置染色瓶中,加入去离子水或缓冲液至瓶颈处,反复多次照射,每次1min,照射5~10次,每次照射后,补充瓶中蒸发掉的液体,照射温度不超过 90°C ~ 95°C 为宜。此处理后,细胞核染色以苏木精为佳。

第三节 组织切片技术

应用于光镜的免疫组织化学染色的切片厚度一般要求 $5\mu\text{m}$ 左右,神经组织的研究要求切片厚度在 $20\sim 100\mu\text{m}$,有利于追踪神经纤维的走行。

一、冰冻切片

是免疫组织化学染色中最常用的一种切片方法。其最突出的优点是能够较完好地保存多种抗原的免疫活性,尤其是细胞表面抗原更应采用冰冻切片。新鲜的组织及已固定的组织均可作冰冻切片。

冰冻时,组织中水分易形成冰晶,往往影响抗原定位。一般认为冰晶大而少时,影响较小,冰晶小而多时,对组织结构损害较大,在含水量较多的组织中上述现象更易发生。冰晶的大小与其生长速率成正比,而与成核率(形成速率)成反比,即冰晶形成的数量愈多则愈小,对组织结构影响愈严重。因此,应尽量降低冰晶的数量。Fish认为冰冻开始时,冰晶成核率较慢,以后逐渐增加,其临界温度为 -33°C ,从 -30°C 降至 -43°C 之间,成核率急剧增加,然后再减慢。基于上述理论可采取以下措施减少冰晶的形成。

1. 速冻 使组织温度骤降,缩短从 -33°C ~ -43°C 的时间,减少冰晶的形成。方法包括:

(1) 干冰-丙酮(酒精)法 将150~200ml丙酮(酒精)装入小保温杯内,逐渐加入干冰,直至饱和呈粘稠状,再加干冰不再冒泡时,温度可达 -70°C ,用一小烧杯(50~100ml)内装异戊烷约50ml,再将烧杯缓慢置入干冰丙酮(纯酒精)饱和液内,至异戊烷温度达 -70°C 时即可使用。将组织(大小为 $1\text{cm}\times 0.8\text{cm}\times 0.5\text{cm}$)投入异戊烷内速冻30~60s后取出,或置恒冷箱内以备切片,或置 -80°C 低温冰箱内贮存。

(2) 液氮法 将组织块平放于软塑瓶盖或特制小盒内(直径约2cm),如组织块小可适量加OCT包埋剂浸没组织,然后将特制小盒缓缓平放入盛有液氮的小杯内,当盒底部接触液氮时即开始气化沸腾,此时小盒保持原位切勿浸入液氮中,大约10~20s组织即迅速冰结成块。取出组织冰块立即置入 -80°C 冰箱贮存备用或置入恒冷箱切片机冰冻切片。

2. 蔗糖溶液应用 将组织置于20%~30%蔗糖溶液1~3d,利用高渗吸收组织中水分,减少组织含水量。

3. 冰冻切片机 影响冰冻切片的因素较多,因此,技术难度较大,选择好的冰冻切片机是保证切片质量的关键。目前冰冻切片机有两类:

(1) 恒冷箱冰冻切片机 为较理想的冰冻切片机,型号很多,但其基本结构是将切片机置于 -30°C 低温密闭室内,故切片时不受外界温度 and 环境影响,可连续切薄片至 $2\sim 4\mu\text{m}$,完全能满足免疫(荧光)组织化学标记要求。切片时,低温室内温度以 $-15\sim -18^{\circ}\text{C}$ 为宜,温度过低组织易破碎,抗卷板的位置及角度要适当,载玻片附贴组织切片,切勿上下移动。

(2) 开放式冰冻切片机 包括半导体制冷切片机和甲醇制冷切片以及老式的 CO₂、氯乙烷等冷冻切片机。切片时暴露空气中, 温度不易控制, 切片技术难度大, 在高温季节, 切片更加困难, 且切片厚 8~15 μ m, 不易连续切片, 但其优点是价廉, 国内有生产。

冰冻切片后如不染色, 必须吹干, 贮存低温冰箱内或进行短暂预固定后贮存冰箱保存。

二、石蜡切片

其优点是组织结构保存良好, 在病理和回顾性研究中有较大的实用价值, 能切连续薄片, 组织结构清晰, 抗原定位准确。用于免疫(荧光)组化技术的石蜡切片制备与常规制片略有不同: ①脱水、透明等过程应在 4℃ 下进行, 以尽量减少组织抗原的损失; ②组织块大小应限于 2cm×1.5cm×0.2cm, 使组织充分脱水、透明、浸蜡; ③浸蜡、包埋过程中, 石蜡应保持在 60℃ 以下, 以熔点低的软蜡最好(即低温石蜡包埋)。

组织块脱水、透明、浸蜡时间: 70%乙醇 4℃, 3~4 h→80%乙醇, 4℃, 3~4 h→90%乙醇, 4℃, 2~3 h→95%乙醇 I, 4℃, 2~3 h→95%乙醇 II, 4℃, 1~2 h→100%乙醇 I, 4℃, 1.5 h→100%乙醇 II, 4℃, 1.5 h→二甲苯 I, 4℃, 0.5~1 h→二甲苯 II, 4℃, 0.5~1 h→石蜡 I, 60℃, 1 h→石蜡 II, 60℃, 2h。

以上全过程为 18~24h, 也可在室温内使用自动脱水机代替。如组织块小, 直径小于 0.5cm, 可用快速石蜡包埋切片, 全过程只需 4 h 左右。

石蜡切片为常规制片技术, 切片机多为轮转式, 切片厚度 2~7 μ m, 应用范围广, 不影响抗体的穿透性, 染色均匀一致。由于甲醛固定、有机溶剂和包埋剂对抗原有一定的损害及遮蔽, 使抗原特征发生改变。有人报道经蛋白酶消化, 可以改善光镜免疫组化染色强度, 常用的有胰蛋白酶、链霉蛋白酶及胃蛋白酶等消化法。石蜡切片应入 37℃ 恒温箱过夜, 这样烤片可减少染色中脱片现象。切片如需长期贮存, 可存放于 4℃ 冰箱内备用。

石蜡切片优点较多, 但在制片过程中要经过酒精、二甲苯等有机溶剂处理, 组织内抗原活性失去较多, 有人采用冷冻干燥包埋法(freeze drying embedding method), 可以保存组织内可溶性物质, 防止蛋白变性和酶的失活, 从而减少了抗原的丢失。该法是将新鲜组织低温速冻, 利用冷冻干燥机(freezing dryer)在真空、低温条件下排除组织内水分, 然后用甲醛蒸气固定干燥的组织, 最后将组织浸蜡、包埋、切片。此法可用于免疫荧光标记、免疫酶标记及放射自显影。

三、振动切片

用振动切片机(vibratome), 可以把新鲜组织(不固定不冰冻)切成薄片 20~100 μ m, 以漂浮法在反应板进行免疫组织化学染色, 然后在立体显微镜下检出免疫反应阳性部位, 修整组织进行后固定, 最后按电镜样品制备、脱水、包埋、超薄切片、染色观察等。组织不冰冻, 无冰晶形成和组织抗原破坏, 在免疫组化染色前避免了组织脱水、透明、包埋等步骤对抗原的损害, 能较好地保留组织内脂溶性物质和细胞膜抗原, 主要用于显示神经系统抗原分布研究。这种包埋前染色, 尤其适用于免疫电镜观察。

四、塑料切片

塑料包埋切片常用包埋剂有甲基丙烯酸酯类(glycol methacrylate, GMA)及环氧树脂类(Epon 812, 618), 其优点是可以同时作光镜和电镜检测, 能相互对照所查抗原, 定位准确。塑料包埋切片可切出比石蜡切片更薄的切片, 光镜切片可薄至 0.5~2 μ m, 故称半薄切片。GMA 保存抗原较好, 不与组织产生共聚合, 但形态学结构欠佳; 环氧树脂如 Epon 和 Araldite 能较好地保存形态学结构, 但在聚合过程中易和组织起作用, 改变抗原结构。塑料包埋切片由于处理程序繁多, 抗原活性易丢失。同时半薄切片进行免疫染色时, 抗血清不易穿透树脂, 因此, 塑料切片主要用于免疫电镜的超薄切片前定位。包埋前染色的标本, 切成薄片后不需染色, 直接在相差显微镜下观察免疫反应部位呈黑点状, 定位后进一步作超薄

切片, 这样, 可以明显提高免疫电镜阳性检出率。

五、超薄切片

电镜标本要制备超薄切片, 用超薄切片机 (ultratome) 进行切片, 可参考相关专著。

六、碳蜡切片

碳蜡 (carbowax), 学名聚乙烯二醇 (polyethylene glycol, PEG), 为水溶性蜡。根据其分子量不同, 碳蜡有多种, 如 400、800、1 000、1 500、4 000、6 000 等, 用于组织包埋的有 1 500、4 000 两种, 其熔点分别 38℃和 52℃左右, 常温下为固体石蜡状, 加温熔化呈液体状。

本法的特点是组织固定水洗后, 不需脱水透明可直接浸蜡包埋, 且切片方法与常规石蜡切片相同。切下的组织片漂浮水面后自然展开, 碳蜡迅速深化, 组织片即可展平, 制片过程简单易行。

具体操作简述如下: ①组织块不宜过大, 一般限定在 1.5cm×1cm×0.1cm 以内; ②组织固定后充分水洗去除固定液, 用滤纸吸干组织表面水; ③将组织浸入碳蜡 (1 500) 内, 45℃, 30min; ④再次浸入混合碳蜡液 (1 500 和 4 000 等量混合液), 52℃, 30min; ⑤浸入等量混合碳蜡液 (或根据气温、湿度变化调整 4 000 和 5 000 混合比例, 如气温高、湿度大可以 4 000:1 500=3:2 混合, 反之, 则以 2:3 混合); ⑥用等量混合碳蜡或调整混合碳蜡包埋成组织蜡块; ⑦切片与石蜡切片相同。在操作过程中, 碳蜡组织块应尽量避免与水或冰接触, 贮存时应密封干燥冷藏。

本法优点是操作程序少、时间缩短、组织不经有机溶剂损害、温度低、抗原性保存比石蜡切片好、组织结构清晰; 缺点是夏季室温高时切片较困难、连续切片不如石蜡切片顺利, 由于碳蜡有强吸湿性, 不易长期保存。

七、玻片处理和涂胶

在免疫组化染色过程中由于各种原因常造成标本 (细胞制片和组织切片) 脱片现象, 影响了工作质量和速度。一般采取两种方法即可防止脱片现象出现。

1. 载玻片和盖玻片处理 新载玻片上有油污, 必须经过清洁液浸泡 12~24h, 流水充分漂洗后用蒸馏水清洗 5 遍以上, 浸泡在 95%酒精内 2h, 用绸布擦干或用红外线烤箱烤干均可, 贮放于玻片盒内备用。盖玻片很薄, 以上处理程序必须缩短, 清洁液浸泡只需 2h, 流水冲洗注意勿损伤玻片等。

2. 载玻片上涂粘附剂 粘附剂种类较多, 常用的有以下几种: ①树脂胶 (resin glue) 又称白乳胶, 为木工用, 有进口、国产之分, 有人认为进口白色树脂胶较稳定, 我们认为国产白乳胶 (聚醋酸乙烯乳液 J-北京产) 质量尚稳定。使用浓度为 1%~2%, 以蒸馏水稀释即可; ②甘油明胶, 混匀后涂在载玻片上, 切片贴附后置有副醛的干燥器内, 80℃加热 1h; ③甲醛明胶, 混合后即可涂片; ④铬明矾明胶, 混合后即可涂片, 置 37℃温箱烤干; ⑤多聚赖氨酸液: 多聚赖氨酸 0.1g, 加蒸馏水 10ml, 混合后即可涂片。此液不宜多配制; ⑥3-amino propyl triethoxy silane (APES)。粘附剂②~⑤配制法见附录二。

第四节 常用组织学研究方法

一、一般光学显微镜术

应用一般光学显微镜 (简称光镜) 观察组织切片是组织学研究的最基本方法。取动物或人体的新鲜组织块, 先用固定剂固定, 使组织中的蛋白质迅速凝固, 防止细胞自溶和组织腐败。常用的固定剂如酒精、甲醛、醋酸、苦味酸、四氧化锇等, 一般常将几种固定剂配制成混合固定液, 以抵消或减弱单种固定剂对组织的收缩或膨胀等缺点, 达到更好固定效果。固定后的组织块 (约 3~5mm³ 大小) 用

石蜡、火棉胶或树脂等包埋成硬块，以切片机切成 5~10 μm 厚的组织切片，切片贴在载玻片上经脱蜡等步骤后进行染色。组织块也可立即投入液氮（-196℃）内快速冻结，用恒冷箱切片机制成冷冻切片，这种方法制片迅速，细胞内酶活性保存较好，常用于酶组织化学染色。血细胞和分离培养的细胞可直接涂在玻片上，制成涂片。疏松结缔组织和肠系膜等软组织可撕成薄片铺在玻片上（铺片），牙和骨等坚硬组织可磨成薄片（磨片）。组织切片等标本经染色、透明后，以封固剂和盖片封固，即可长期保存，镜下观察。

染色是用染料使组织切片着色，便于镜下观察。天然和人工合成的染料甚多，它们都是含发色团的有机化合物，当染料具有助色团成为盐类物质，即可溶解于水并具电荷，与组织有亲和力，使组织着色。含氨基（-NH₂）、二甲氨基〔-N（CH₃）₂〕等碱性助色团的染料，称碱性染料（basic dye），它的盐溶液具阳电荷；含羧基（-COOH）、羟基（-OH）或磺基（-SO₃H）等酸性助色团的染料，称酸性染料，它的溶液具阴电荷。组织的染色原理一般认为基于化学结合或物理吸附作用。细胞和组织的酸性物质或结构与碱性染料亲和力强者，称嗜碱性；而碱性物质或结构与酸性染料亲和力强者，称嗜酸性；若与两种染料的亲和力均不强，称中性。组织的基本成分是蛋白质，构成蛋白质的氨基酸常是既有含氨基的，也有含羧基的，是两性电解质。各种蛋白质的等电点因氨基酸成分的不同而异，其电荷性质又与溶液的 pH 值相关，根据研究目的选用合适的染色方法，调整好染液的 pH 值，即可取得良好染色效果。常用的酸性染料如伊红、坚牢绿、橙黄 G 等，碱性染料如苏木精、亚甲蓝、碱性品红等。组织学中最常用的是苏木精（hematoxylin）和伊红（eosin）染色法，简称 HE 染色法。苏木精使细胞核和胞质内的嗜碱性物质着蓝紫色，伊红使细胞质基质和间质内的胶原纤维等着红色。

物理吸附作用的染色方法，如用苏丹染料显示脂肪组织，染料溶于脂肪内，使细胞内的脂滴显色；又如用硝酸银、氯化金等重金属盐显示细胞和组织的某些结构，则是使金属微粒附着在结构表面呈棕黑色或棕黄色。银染法中有些组织结构可直接使硝酸银还原面显示，称此为亲银性（argentaffin）；有些结构无直接还原作用，需加入还原剂方能显色，则称为嗜银性（argyrophilia）。还有些组织成分如结缔组织和软骨基质中的糖氨多糖，当用甲苯胺蓝（toluidine blue）等碱性染料染色后呈紫红色，这种现象称为异染性（metachromasia），其原理可能是该染料在溶液中呈单体状态时显蓝色，当它与多阴离子的高分子物质耦合后，染料分子聚合成多聚体面显红色。还有些染色方法的原理至今还不清楚。

二、几种特殊显微镜的应用

1. 荧光显微镜（fluorescence microscope） 荧光显微镜是用来观察标本中的自发荧光物质或以荧光素染色（标记）的细胞和结构。荧光显微镜是以高压汞灯产生的短波紫外线为光源，并配有激发、阻断、吸热和吸收紫外线等滤片系统，标本中的荧光物质在紫外线激发下产生各种颜色的荧光，借以研究该荧光物质在细胞和组织内的分布。组织中的自发性荧光物质如神经细胞和心肌细胞等内含的脂褐素呈棕黄色荧光，肝贮脂细胞和视网膜色素上皮细胞内的维生素 A 呈绿色荧光，某些神经内分泌细胞和神经纤维内的单胺类物质（儿茶酚胺、5-羟色胺、组胺等）在甲醛作用下呈不同颜色的荧光，组织内含有的奎宁、四环素等药物也呈现一定的荧光。细胞内的某些成分可与荧光素结合而显荧光，如溴化乙锭与吖啶橙可与 DNA 综合，进行细胞内 DNA 含量测定。荧光显微镜更广泛用于免疫细胞化学研究，即以异硫氰酸或罗丹明等荧光素标记抗体（一抗或二抗），用该标记抗体直接或间接地与细胞内的相应抗原结合，以检测该抗原的存在与分布。

2. 相差显微镜（phase contrast microscope） 相差显微镜是用于观察组织培养中活细胞形态结构的。活细胞无色透明，一般光镜下不易分辨细胞轮廓及其结构。相差显微镜的特点是将活细胞不同厚度及细胞内各种结构对光产生的不同折射作用转换为光密度差异（明暗差），使镜下结构反差明显，影像清楚。组织培养研究常用的是倒置相差显微镜（inverted phase contrast microscope），它的光源和聚光器在载物台的上方，物镜在载物台的下方，便于观察贴附在培养器皿底壁上的活细胞。

3. 暗视野显微镜 (dark-field microscope) 暗视野显微镜主要用于观察因反差或分辨力不足的微小颗粒。此种显微镜主要有一个暗视野集光器,使光线不直接进入物镜,故呈暗视野。而标本内的小颗粒产生的衍射光或散射光进入物镜,暗视野中的颗粒呈明亮小点,如同在暗室可见一束光线中的微小尘粒一般。普通通光镜最大分辨率为 $0.2\mu\text{m}$,暗视野显微镜则可分辨 $0.004\sim 0.2\mu\text{m}$ 的微粒,适用于观察细胞内线粒体运动及标本中细菌等微粒的运动等。

4. 激光扫描共聚焦显微镜 (laser scanning confocal microscope, LSCM) 激光扫描共聚焦显微镜是近 10 年研制成的高光敏度、高分辨率的新型仪器。它以激光为光源,光束经聚焦后落在样品(组织厚片或细胞)不同深度的微小一点,并作移动扫描,通过电信号彩色显像,经过微机图像分析系统进行二维和三维分析处理。LSCM 可对细胞进行三维结构图像分析,细胞内各种荧光标记物的微量分析,细胞内 Ca^{2+} 、pH 值等的动态分析测定,细胞的受体移动、膜电位变化、酶活性和物质转运的测定,并以激光对细胞及其染色体进行切割、分离、筛选和克隆。因此, LSCM 是一种高技术产品,可对细胞的多种功能进行全自动、高效、快速的微量定性和定量测定。

其他如偏光显微镜用于研究组织晶体物质及纤维等的光学性质,紫外光显微镜用于研究细胞内核酸的分布与定量等。

三、组织化学和细胞化学术

组织化学 (histochemistry) 和细胞化学 (cytochemistry) 技术是通过化学或物理反应原理显示组织切片细胞内某种化学成分,从而进行定位、定量及其与功能相关的研究。如糖类、脂类、酶、核酸等与试剂发生化学物理反应,形成有色终末产物,在光镜下观察,有的可在电镜下观察。

1. 糖类 显示多糖和蛋白多糖的常用方法是过碘酸-雪夫反应 (periodic acid Schiff reaction, PAS 反应)。基本原理是过碘酸的氧化作用先使糖分子的乙二醇基变为乙二醛基,后者继而与 Schiff 试剂(无色亚硫酸品红复合物)结合,形成紫红色反应产物。颜色反应的深浅取决于组织内多糖的乙二醇分子的多寡。

2. 脂类 脂类物质包括脂肪和类脂。标本用甲醛固定,冷冻切片,脂类保存较好。多用苏丹染料、油红 O、尼罗蓝等溶于脂类的染料染色,使脂质呈色。也可用四氧化锇 (OsO_4) 染色,脂肪酸或胆碱可使 OsO_4 还原为 OsO_2 而呈黑色。

3. 酶 细胞内的酶种类甚多,有氧化还原酶、水解酶、合成酶、转移酶等几类,目前已有 100 多种酶组织化学染色法。酶组化反应的基本原理是利用酶对其相应底物的水解、氧化等作用,然后再使底物的反应产物与某种捕获剂发生反应,形成沉淀或有色终产物,借此检测该酶在组织切片或细胞内的分布及活性强弱。如细胞的磷酸酶是一种重要的水解酶,碱性磷酸酶 (ALP) 和酸性磷酸酶 (ACP) 在合适的 pH 条件下可水解有机磷酸酯。小肠上皮细胞表面的纹状缘和肾近曲小管表面的刷状缘处,微绒毛含有丰富的 ALP,与物质的吸收和转运功能相关。许多细胞的溶酶体内则含大量 ACP,参与细胞内物质代谢。这两种酶均可以 β -甘油磷酸钠为底物,底物被水解产生磷酸根,再以 Ca^{2+} 、 Co^{3+} (显示 ALP) 或 Pb^{2+} (显示 ACP) 捕获磷酸根,最后用硫化铵处理,即形成硫化钴或硫化铅黑色终产物,出现在组织切片中该酶存在的部位。因此,酶组化染色不是酶本身的直接显色,而是酶作用底物的化学反应产物显色。

4. 核酸 显示 DNA 的传统方法是 Feulgen 反应,切片先用稀盐酸处理,使 DNA 分子中脱氧核糖与嘌呤之间的连接键打开,形成醛基,再与 Schiff 试剂作用,原理同 PAS 反应,使细胞核 DNA 显紫红色。还可利用甲基绿-焦宁染色法同时显示 DNA 和 RNA,这两种染料都是碱性,甲基绿使细胞核内的 DNA 呈蓝绿色,焦宁使细胞质和核仁内的 RNA 呈红色。

四、免疫细胞化学术

免疫细胞化学 (immunocytochemistry) 术是应用抗原与抗体结合的免疫学原理,检测细胞内多肽、

蛋白质及膜表面抗原和受体等大分子物质的存在与分布。这种方法特异性强、敏感度高、进展迅速、应用广泛,成为生物学和医学等众多学科的重要研究手段。近年随着纯化抗原和制备单克隆抗体的广泛开展以及标记技术不断提高,免疫细胞化学的进展更是日新月异,不仅用于许多基本理论的研究并取得了重大突破,而且也用于疾病的早期快速诊断等临床实际。组织的多肽和蛋白质种类繁多并具有抗原性,分离纯化人或动物组织某种蛋白质,作为抗原注入另一种动物体内,后者即产生相应的特异性抗体(免疫球蛋白)。从被免疫动物的血清中提取出该抗体,再以荧光素、酶、铁蛋白或胶体金标记,用这种标记抗体处理组织切片或细胞,标记抗体即与细胞的相应蛋白质(抗原)发生特异性结合。常用的荧光素是异硫氰酸荧光素(FITC)和四甲基异硫氰酸罗丹明(TRITC),在荧光显微镜下可观察荧光抗体抗原复合物。常用的酶是辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP, 从辣根菜中提取的),它的底物是3,3'-二氨基联苯胺(DAB)和 H_2O_2 , HRP使DAB氧化形成棕黄色产物,可在光镜和电镜下观察。铁蛋白和胶体金标记抗体与抗原的结合,也可在光镜和电镜下观察。

标记抗体与被检抗原的结合方式有两种:一是直接法,即如上述用标记抗体与样品中的抗原直接结合,这种方法操作简便,但敏感度不及间接法;间接法是将分离的抗体(第一抗体简称一抗)再作为抗原免疫另一种动物,制备该抗体(抗原)的抗体(第二抗体简称二抗),再以标记物标记二抗,先后以一抗和标记二抗处理样品,最终形成抗原-一抗-标记二抗复合物。间接法中的一个抗原分子可通过一抗与多个标记二抗相结合,因此它的敏感度较高,而且目前国内外均有多种标记二抗商品供应,使用方便。间接法中较常用的是一种称之为过氧化物酶-抗过氧化物酶复合物法(peroxidase-antiperoxidase complex method, PAP法),该法除需一抗和二抗外,还需制备HRP标记的抗酶抗体,即以HRP作为抗原免疫动物,制成抗HRP抗体,再以HRP标记该抗体制成由3个酶分子与2个抗酶抗体组成的相当稳定的环形PAP复合物。标本先后以一抗、二抗和PAP复合物处理后,再以DAB显色,即可检测抗原的分布。此法由于细胞内的抗原通过抗体的层层放大而与多个酶分子结合,因此敏感性很强。

生物素(biotin)又称维生素H,是从卵黄和肝中提取的一种小分子物质(分子量244.31);亲合素(avidin)又称卵白素,是从卵白中提取的一种糖蛋白(分子量68kD)。每个亲合素分子有生物素结合的4个位点,二者可牢固结合成不可逆的复合物。生物素-亲合素的应用大致有三种方法;①标记亲合素-生物素法(labelled avidin-biotin method, LAB法):将亲合素与标记物(HRP)结合,一个亲合素可结合多个HRP;将生物素与抗体(一抗与二抗)结合,一个抗体分子可连接多个生物素分子,抗体的活性不受影响。细胞的抗原(或通过一抗)先与生物素化的抗体结合,继而将标记亲合素结合在抗体的生物素上,如此多层放大提高了检测抗原的敏感性;②桥连亲合素-生物素法(bridged avidin-biotin method, BAB法):先使抗原与生物素化的抗体结合,再以游离亲合素将生物素化的抗体与酶标生物素搭桥连接,也达到多层放大效果;③亲合素-生物素-过氧化物酶复合物法(avidin-biotin-peroxidase complex method, ABC法):此法是前两种方法的改进,即先按一定比例将亲合素与酶标生物素结合在一起,形成亲合素-生物素-过氧化物酶复合物(ABC复合物),标本中的抗原先后与一抗、生物素化二抗、ABC复合物结合,最终形成晶格样结构的复合体,其中网络了大量酶分子,从而大大提高了检测抗原的灵敏度。现有已配制好的ABC药盒商品供应,操作简便,是目前广泛应用的一种方法。

五、放射性核素示踪术

放射性核素示踪术是用放射性核素的射线作用,研究细胞对某种物质的吸收、合成、转运和分泌等代谢过程。将放射性核素或其标记物注入动物体内或加入细胞培养的培养基内,细胞摄取该物质后,取被检组织制成切片或细胞涂片。可用显微镜放射自显影术(microautoradiography)检测该放射性物质在细胞内的原位分布及其代谢转归,即将薄层感光乳胶涂在切片或涂片的表面,标本在暗盒内保存一定时间后,细胞内的放射性核素产生的射线使乳胶中的溴化银还原为银粒,经显影和定影后在光镜下观察银粒的分布。 β 射线能量低,射程短,电离作用强,常用的 β 射线核素是 3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{45}Ca 、 ^{131}I 。如

用 H-胸腺嘧啶核苷研究细胞 DNA 合成及细胞增殖动态, 用 S-蛋氨酸研究某些腺细胞分泌物的合成与排泄, 用 I-碘化钠研究甲状腺素的合成等。还可对标本中的银粒数计量或其光密度进行测定和定量分析。另外, 也可用液体闪烁计数器测定分离细胞或其匀浆的放射线强度, 进行定量研究。

六、原位杂交术

原位杂交术 (in situ hybridization) 是一种核酸分子杂交技术, 它是通过检测细胞内 mRNA 和 DNA 序列片段, 原位研究细胞合成某种多肽或蛋白质的基因表达。其基本原理是根据两条单链核苷酸互补碱基序列专一配对的特点, 应用已知碱基序列并具有标记物的 RNA 或 DNA 片段即核酸探针 (probe), 与组织切片或细胞内的待测核酸 (RNA 或 DNA 片段) 进行杂交, 通过标记物的显示, 在光镜或电镜下观察目的 mRNA 或 DNA 的存在与定位。此项技术需首先制备某种核酸探针, 其种类主要有三种: ①利用大肠杆菌重组带有目的基因的质粒 DNA, 制成互补 DNA 探针 (cDNA); ②应用限制性核酸内切酶消化制成线性 DNA 模板, 在体外转录获得反义 RNA 探针 (cRNA); ③依照待测核酸的核苷酸序列, 应用 DNA 合成仪合成寡聚核苷酸探针。cRNA 和 cDNA 的常用标记物有 ^{32}S 、 ^{32}P 、 ^3H 等放射性核素和荧光素、生物素、地高辛等非放射性物质。组织学应用的原位杂交术主要是染色体原位杂交和细胞原位杂交。前者是研究遗传基因、抗原基因、受体基因、癌基因等在染色体上的定位与表达; 后者是研究细胞某种蛋白质的基因转录物 mRNA 在胞质内的定位与表达。核酸分子杂交术有很高的敏感性和特异性, 它是免疫细胞化学的基础上, 进一步可从分子水平探讨细胞功能的表达及其调节机制, 已成为当前细胞生物学、分子生物学研究的重要手段。

七、细胞和细胞化学定量术

组织和细胞形态结构及其化学成分的定量研究是以量的测定及其数据变化阐述组织和细胞的生长、分化、代谢和功能的演变以及对环境因素和致病因素的反应的。生命科学的研究不断深入, 定量技术的应用日益广泛并有所进展。

1. 显微镜分光光度术 (microspectrophotometry) 此方法是应用显微分光光度计 (microspectrophotometer) 测定组织化学和免疫组织化学染色标本的反应强弱, 进行化学成分的定量分析的。基本原理是由于细胞内某种物质的含量不同, 其染色反应的深浅不一, 对一定波长的光吸收也就不同, 即某物质的消光度与一定厚度和面积内的该物质浓度成正比。通过光电组合自动控制系统将消光度转换为电信号, 即可得出光密度值 (OD 值) 进行定量分析比较。前述荧光素染色、酶和核酸组织化学染色、多肽和蛋白质免疫组化染色、放射自显影和原位杂交等标本, 均可应用显微分光光度计做定量分析。

2. 形态计量术 (morphometry) 形态计量术是运用数学和统计学原理对组织和细胞进行二维和三维的形态测量研究, 如细胞及其微细结构成分的数量、体积、表面积、周长等的相对和绝对值的测量, 其中三维立体结构的研究又称体视学 (stereology)。机体组织的光镜结构计量已有不少有意义的资料, 如人和动物的肺泡数量和表面积、肾小体的数量和体积比、肝细胞的体积和数量、胰岛的数量及各类细胞的数量比、腺垂体各种内分泌细胞的数量比等。通过组织切片或照片 (光镜和电镜) 平面图像的测量, 推算其立体结构数值, 传统方法是将测试系统 (点、线、方格等) 投影或覆盖在切片上或照片上, 把若干样品的平面测量数据按数学公式推算出其立体数值。目前已广泛应用图像分析仪 (image analyzer) 进行形态计量研究, 该仪器也是光学、电子学和计算机高技术产品, 它是将切片或照片图像通过摄像机显示于监视器屏幕上, 并根据不同结构的颜色深浅 (灰度) 及各像点的大小位置, 快速准确地得出所需的各种形态数据。组织化学和免疫组织化学染色标本, 也可应用图像分析仪测定其光密度值, 进行定量分析。

3. 流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 流式细胞术是近年建立的细胞分类和定量研究技术, 它是应用流式细胞仪 (或称荧光激活细胞分选器, fluorescent activated cell sorter) 对单个细胞生物化学和生物物理特性进行快速定量测定的。工作原理是先分离被检细胞制成悬液, 并作荧光染色或标记, 使单

细胞液流快速通过该仪器的激光器照射分析区,被检细胞产生的不同荧光信号转变为电脉冲,分别输入计算机内贮存,并显示于示波器屏幕上,即可获得该细胞群体中不同类型细胞的有关数据,如不同细胞的数量、荧光强度以及细胞体积、表面积和内部结构等参数;还可使细胞附有不同电荷,分类收集各种细胞。该技术的特点是速度快、精确性高、灵敏度大,已成为细胞动力学、遗传学、免疫学、肿瘤学等研究的重要手段。如细胞 DNA、RNA 或某种蛋白质的含量分析,单个染色体 DNA 含量及分选,淋巴细胞膜抗原或受体的分析及细胞亚群分选,杂交细胞等的分选等,也用于肿瘤临床诊断及疗效和预后的分析。

八、电子显微镜术

1. 透射电镜术 (transmission electron microscopy, TEM) 透射电镜是以电子束穿透样品(组织的超薄切片),经聚合放大后,显像于荧光屏上进行观察和摄片的。电镜的放大倍数的分辨率比光镜大得多,放大倍数为几万至几十万倍,分辨率可达 0.2nm。标本制备较光镜的更严格,新鲜组织切成小块(1mm³),用戊二醛、多聚甲醛、四氧化锇等固定,树脂包埋,以超薄切片机切成厚 50~80nm 的超薄切片,经醋酸铀和枸橼酸铅等重金属电子染色后,置于电镜下观察,标本在荧光屏上呈黑白反差的结构影像。被重金属浸染呈黑色的结构,称电子密度高(electron-dense);反之,浅染的部分称电子密度低(electron-lucent),这种染色称正染色(positive staining)。若被染结构着色浅淡,而其周围部分染成黑,是称为负染色(negative staining)。透射电镜的电子枪加速电压 50~100kV,电子束穿透力低,近年制成加速电压 500kV 以上的超高压电镜,电子束穿透力很强,可观察 0.5~10nm 厚切片,观察细胞内骨架等的立体超微结构。应用电镜观察细胞化学染色标本,称电镜细胞化学术(electron microscope cytochemistry);电镜观察免疫细胞化学染色标本,称免疫电镜术(immunoelectron microscopy);电镜与放射自显影结合的方法称电镜放射自显影术(electron microscope autoradiography)。

2. 扫描电镜术(scanning electron microscopy, SEM) 扫描电镜是用于观察组织表面的立体结构的。组织块经固定后,置于真空镀膜仪内干燥,在标本表面先后喷镀一层碳膜和合金膜,即可置于镜下观察。扫描电镜的景深长,样品表面的金属膜可提高其导电性和图像反差,在荧光屏上扫描成像,呈现富有立体感的表面图像,如细胞表面的突起、微绒毛、纤毛及细胞的分泌与吞噬行为等。

3. 冷冻蚀刻复型术和冷冻割断术 冷冻蚀刻复型术(freeze etch replica)是在透射电镜下观察组织或细胞断裂面的金属复制膜,显示细胞微细结构的立体影像。组织块先经甘油生理盐水处理(防止形成冰晶)后投入液氮快速冷冻,在低温下用钢刀将样品劈开,形成凹凸不平的断裂面,-100℃真空下使断裂面的冰晶升华,暴露不平整表面,在断裂面上先后喷镀一层合金膜和碳膜,用次氯酸等将组织腐蚀掉。将反差的凹凸不平的金属复型膜置于镜下观察。此项技术尤适用研究生物膜的内部结构,如从单位膜的脂质分子疏水端劈开,经蚀刻镀膜,镜下可见质膜断裂面复型膜结构状态,其凹凸影像恰与实物相反。

冷冻割断术(freeze cracking)是将固定组织包埋在树脂内,低温下割断,断面喷镀合金,在扫描电镜下观察断面的立体构型。该技术适于研究组织内部微细结构的相互关系,如肝细胞与肝血窦和胆小管的关系,肾小体的肾小囊与血管球的关系等。

4. 电镜 X 线显微分析术 X 线显微分析术(X-ray microanalysis)是研究细胞和组织内元素的种类、分布和含量的新技术。它是利用高速电子束轰击电镜内生物标本的微小区域,使该区所含的元素发射了一定波长的 X 射线,通过检测器对 X 射线进行波谱或能谱分析,即可测定微区内元素的性质、含量和分布。如测定细胞内 Na、K、Ca、Fe、P、Cl 等及某些微量元素的含量和分布变化,探讨各种元素与细胞生理和病理的关系。

九、组织培养术

前述几种方法都是取人体或在体(*in vivo*)实验动物的组织,经固定等处理后,对已死亡的组织进行观察研究的。组织培养(tissue culture)或称体外实验(*in vitro*)则是取活组织或活细胞在体外适宜

的环境中培养成活，从而进行实验研究。细胞在体外生存必须具有近似体内的生存条件，如充足营养供应、合理的 O_2 与 CO_2 比例、必要的电解质和适宜的渗透压、pH 值、温度和湿度等，还需防止微生物污染。组织培养的特点在于可用研究各种理化因子（温度、激素、药物、毒物等）对活细胞的直接影响，并能观察记录（摄影、录像）。组织培养与前述方法结合应用，可研究某种因素对细胞增殖、分化、代谢、运动、吞噬、分泌等影响和调节的动态过程，以及细胞病变、癌变和逆转等机理，获得在体实验难以达到的研究目的。

组织培养用液为平衡盐水及血清（小牛血清、胎盘血清等）、羊水、腹水、组织浸出液等天然培养基（natural medium）。天然培养基成分复杂，且不稳定。目前广泛应用的人工合成培养基（synthetic medium）多种商品供应，使用方便，但仍需补充部分血清等。若仅用合成培养基和已制备好的几种必需因子与激素，称此为无血清培养基（serum-free medium），其成分和含量均是已知的，可精细研究某种因子对细胞的生物效应。

组织培养的方法甚多，常用容器有凹玻片、培养皿、培养瓶、培养板、流动小室等。取组织块贴于瓶底进行培养，可观察从组织块生长迁移出的细胞。取胚胎某器官原基或器官的一部分进行培养，称为器官培养（organ culture）。更精细的方法是分离和纯化组织中的某种细胞，使之贴附在瓶底形成单层细胞，称此为细胞培养（cell culture），首次培养的细胞，称原代培养（primary culture）；细胞增殖而密集再传代培养，称传代培养（subculture）；经长期培养而成的细胞群体，称细胞系（cell line）；用细胞克隆（cell clone）或单细胞培养而建成的某种纯细胞群体，称细胞株（cell strain）。它们均可在液氮内长期冻存，供随时应用。现已建成多种肿瘤细胞株，广泛用于实验研究。

十、细胞融合术

2 个或 2 个以上的细胞融合成为一个细胞，称为细胞融合（cell fusion）。正常人体内也有细胞融合现象，如两性生殖细胞结合而成受精卵，多个巨噬细胞融合成一个体积很大的多核异物巨细胞。体外用人工方法使两种细胞融合，制成一种新品系的杂交细胞（hybrid cell），筛选出的此种杂交细胞有很强的生命力，增殖也很旺盛。常用的细胞融合诱导物是仙台病毒（Sendai virus）和聚乙烯二醇（polyethyleneglycol, PEG）。细胞融合术是细胞遗传学、细胞免疫学、病毒学、肿瘤学等研究的一种重要手段，如将受抗原刺激后的小鼠脾淋巴细胞分离出来，与已建立的小鼠骨髓瘤（浆细胞瘤）细胞融合，筛选出的杂交瘤细胞可长期存活和增殖，成为制备单克隆抗体的细胞株。

第二十六章 免疫荧光细胞化学技术

免疫细胞化学又称免疫组织化学，其主要原理是用标记的抗体（或抗原）对细胞或组织内的相应抗原（或抗体）进行定性、定位或定量检测，经过组织化学的呈色反应之后，用显微镜、荧光显微镜或电子显微镜观察。凡是能作抗原、半抗原的物质，如蛋白质、多肽、核酸、酶、激素、磷脂、多糖、受体及病原体等都可用相应的特异性抗体在组织、细胞内将其用免疫细胞化学手段检出和研究。免疫荧光细胞化学是根据抗原抗体反应的原理，先将已知的抗原或抗体标记上荧光素制成荧光标记物，再用这种荧光抗体（或抗原）作为分子探针检查细胞或组织内的相应抗原（或抗体）。在细胞或组织中形成的抗原抗体复合物上含有荧光素，利用荧光显微镜观察标本，荧光素受激发光的照射而发出各种颜色的荧光，可以看见荧光所在的细胞或组织，从而确定抗原或抗体的性质、定位，以及利用定量技术测定含量。免疫荧光细胞化学是现代生物学和医学中广泛应用的技术之一。它与亲合化学技术如葡萄球菌 A 蛋白（SPA）、生物素与卵白素、植物血凝素（ConA 等）相结合拓宽了领域；与激光技术、电子计算机和扫描电视等技术结合发展为定量免疫荧光细胞化学技术；荧光激活细胞分选器（FACS）的应用使免疫荧光细胞化学技术发展到了更高的阶段，开创了免疫荧光技术的新领域。细胞显微分光光度计与图像分析仪的结合使免疫荧光组织化学的定量检测更加准确。在免疫荧光细胞化学中应用单克隆抗体日益增多，将会不断提高特异性、敏感性和应用范围。共聚焦激光扫描显微镜的应用大大扩展了免疫荧光细胞化学的应用范围。免疫荧光细胞化学的特异性、快速性和在细胞和分子水平定位的敏感性与准确性，在免疫学、微生物学、细胞和组织学、病理学、肿瘤学以及临床检验学等生物学和医学的许多方面得到广泛应用，日益发挥重要的作用。免疫荧光细胞化学的突出优点包括：①高度特异性：抗原抗体反应是特异性最强的反应之一，免疫荧光细胞化学所用的抗体必须是特异性强的多价或单价抗体，具有高度的识别能力，在抗原识别上可达到单个氨基酸的水平，这是其他组织化学难以相比的；②高度敏感性：免疫荧光细胞化学采用各种有效方法最大限度保存细胞和组织内待检物质的抗原性或采用各种增敏方法，使用高度敏感的和高亲和力的抗体，保证可检出细胞内超微量的抗原成分，用显微镜或电子显微镜观察结果，因此它是在细胞、分子水平或基因水平的检测技术；③方法步骤统一：若掌握一种技术操作方法步骤，则一通百通；④形态、机能和代谢密切结合：是一种综合定性、定位和定量密切结合，形态、机能和代谢密切结合为一体的研究和检测技术。免疫荧光细胞化学技术在细胞、染色体或亚细胞水平原位检测抗原分子，是其他任何生物技术难以达到和代替的，它可在细胞、基因和分子水平同时原位显示基因及其表达产物，形成了新的检测系统，为生物学、医学和各个领域分子水平的研究与诊断开拓了广阔的前景。

免疫细胞化学的全过程包括：抗原提取和纯化，免疫动物或细胞融合（单克隆抗体），抗体效价检测和提取、标记抗体，细胞和组织切片标本的制备，免疫细胞化学反应和显色，观察和记录结果。由此可见，免疫细胞化学（包括免疫荧光细胞化学）的基本理论是抗原抗体反应，标记化学反应和呈色化学反应。由于免疫细胞化学和原位核酸分子杂交是在细胞和组织上进行抗原抗体反应，所以，必须熟练掌握显微标本制备的全过程，要求待检标本形态结构和抗原性保存良好，抗原不从原位扩散或丢失。所以从事免疫荧光细胞化学的工作者必须了解有关理论及掌握有关细胞和组织学技术。

第一节 有关的免疫学基础理论

一、抗原、抗体的概念及抗原抗体的关系

1. **抗原 (antigen)** 凡能刺激机体产生抗体,并能与抗体发生特异性结合的物质称为抗原。物质所具有的这种特性称为抗原性 (antigenicity)。

2. **抗体 (antibody)** 是机体受抗原刺激后,在体液中出现的一种能与相应抗原发生反应的球蛋白,称免疫球蛋白 (Immunoglobulin, Ig)。含有免疫球蛋白的血清称免疫血清。

3. **抗原与抗体的关系** 抗原是引起机体产生免疫反应的主要外因,决定免疫反应的特异性,机体与抗原物质的斗争过程中为加速循环和排除抗原而产生的抗体、致敏淋巴细胞等物质,是机体排除异物物质的保护性反应。没有抗原的刺激,机体不能产生抗体;没有抗原物质,也无法检测抗体的存在;利用抗体可以检测抗原物质。

二、抗原的性质及种类

(一) 抗原的性质

1. **抗原的来源** 抗原可以是异种异物物质、同种异物物质或自身物质。机体能对进入体内的异种、异体的大分子物质产生抗体,该物质与机体的种类关系愈远,其抗原性就愈强,机体的免疫反应也更强。例如鸭血清蛋白对鸡的免疫原性较弱,而对家兔则能引起较强的免疫反应。同种异物物质也可具有抗原性,同种不同个体之间,同一类型的细胞和组织,其抗原性也有差异,例如人的红细胞有 ABO 血型抗原及 Rh 型抗原,人类白细胞和其他组织的细胞膜上也具有组织相容性复合物的抗原物质。机体对本身所具有的物质不产生免疫反应,但在某些条件下,使机体某种物质、细胞或组织成分具有抗原性时,也可导致机体产生免疫反应,此具有抗原性的自身物质称自身抗原 (autoantigen),所产生的抗体称为自身抗体 (autoantibody)。如自身组织变性,机体组织或细胞在各种理化因素作用下,引起化学组成的分子排列和构型改变,形成新的抗原决定簇,例如服用安替比林等药所致白细胞减少,就是由于所服用药物改变了白细胞的一部分表面化学结构,形成新的抗原决定簇,激活免疫活性细胞产生白细胞抗体 (自身抗体),导致白细胞减少。在外伤、感染和炎症时,可能使隐蔽性抗原如精子、甲状腺球蛋白等释放,引起机体产生免疫反应。但应注意,并非异物都是抗原,例如砂尘和一些非生物性高分子聚合物,仅能激发细胞吞噬反应而不能使机体产生抗体或致敏淋巴细胞。

2. **大分子胶体** 凡具有抗原性的物质,分子愈大,抗原性愈强 (如细菌、蛋白质)。一般认为抗原分子量愈大,其表面积相应较大,接触免疫细胞机会增多,在体内停留时间较长,不易排除,因而对机体刺激作用也强。一般具有免疫原性的物质,其分子量常在 10 000 道尔顿以上。对于蛋白质组成的抗原,其分子量小于 5 000~10 000 道尔顿,免疫原性很弱或完全没有。但某些低分子量多肽如胰岛素 (分子量 5 734 道尔顿)、高血糖激素 (分子量 3 800 道尔顿)、血管紧张素 (分子量 1 031 道尔顿)、对实验动物还是具有一定的免疫原性。分子量小的物质团聚成的多聚体或吸附于其他胶体 (载体) 表面,形成大分子表面结构时,如和蛋白质结合即具有大分子胶体特性,可使小分子物质获得或增强抗原性,如细菌的多糖成分、青霉素等化学药物。

3. **抗原的特异性** 各种抗原物质的化学组成虽然很复杂,但能刺激机体产生抗体并与抗体反应相结合的化学组成仅仅是抗原物质表面的一些具有活性的化学基团-化学结构及空间构型,称为抗原物质决定簇 (antigenic determinant)。各种抗原物质各有其特异的抗原决定簇,但不同的抗原物质常含有共同的抗原成分,称为类属抗原。在分类上相近的种类之间的同一类蛋白质抗原,可表现出类属抗原关系。

多种物质结构的相似性,决定这些物质抗原上的类属关系,而分子结构的差异性,决定各种物质的抗原特异性。

抗原的特异性是临床诊断、预防、治疗的基础。各种特异诊断抗体的制备依靠特异性抗原物质的获得;在不易获得特异性抗原的条件下,可利用类属抗原代替。但在鉴别抗原时,应注意区分类属抗原,以免误诊。

一般认为,环状构型要比直线排列的分子免疫原性强,聚合状态的比单体强。具有大分子量的异物,无论具有何种构型,基本上具有免疫原性,但明胶和核酸免疫原性很弱或无。

免疫原的抗原决定簇是否暴露、抗原决定簇之间的距离是否适当,对于免疫原性强弱亦有很大影响。凡暴露的抗原决定簇的数目多、间距大,免疫原性也就较强。能与抗体分子结合的抗原决定簇的总数,称为抗原的结合价。简单的半抗原一般只能与一个抗体分子结合,是单价抗原。根据抗原分子大小推算,有100个氨基酸的多肽,约有14~20个不重叠的抗原决定簇,即有14~20个抗原结合价。

(二) 抗原的种类

医学上常见的抗原物质种类很多,如病原微生物及其代谢产物(毒素),异种动物血清(各种抗毒素,免疫血清的来源),同种血型抗原,同种异体皮肤、器官等组织抗原,自身组织抗原,肿瘤细胞抗原。具有抗原性的各种化学成分有蛋白质、脂蛋白、多糖体、脂多糖、糖蛋白、多肽以及核蛋白等,这些抗原物质均可刺激机体产生抗体或细胞免疫反应。根据引起抗体产生的特点,抗原可分为完全抗原和不完全抗原两大种类。

1. 完全抗原 完全抗原是指能在机体内引起抗体形成(免疫原性),并可与其抗体特异性结合(反应原性)的物质。如细菌、蛋白质等。

2. 不完全抗原或称半抗原(hapten) 在体内单独存在时不引起抗体产生,当其与蛋白质或胶体颗粒结合后,则可引起抗体形成。半抗原可与其特异性抗体结合,如细菌的多糖和类脂质等。在半抗原与蛋白质结合物中,一般是蛋白质使结合物具有抗原性,而半抗原则决定结合物的抗原特异性。例如,以半抗原 α 与蛋白质A结合免疫动物,产生抗半抗原 α 的抗体,不仅可以和结合在蛋白质A上的 α 抗原结合,也可以和结合在蛋白质B上的 α 抗原结合。

三、抗体的性质和种类

(一) 抗体的一般性质

抗体是免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig),人类免疫球蛋白有五类,即IgG、IgA、IgM、IgD及IgE。

IgG分子由4条对称的多肽链用二硫键以共价和非共价键联结组成,其中两条长链(由420~450个氨基酸组成)称为重链(heavy chain,简称H链);两条短链(由212~214个氨基酸组成),称轻链(light chain,简称L链)。重链占IgG分子的2/3,轻链占1/3。这个四链结构是各类免疫球蛋白的基本结构,可用通式 L_2H_2 表示, L_2H_2 称为一个单体,IgG、IgD和IgE都是单体,而分泌性IgA含两个单体,IgM含有5个单体。L链根据抗原体的不同分为k(Kappa)型和 λ (Lambda)型,又可分为若干个亚型。多肽链的羧基端称为C末端,氨基端称N末端。多肽链的N末端包括L链的1/2和H链的1/4,氨基酸顺序随免疫的抗原不同而异,称为可变区(variable region, V区)。多肽链的羟基端包括L链1/2与H链的3/4,氨基酸顺序排列比较稳定,称为稳定区(constant region, C区)。免疫球蛋白结合抗原的不同特异性,决定于L链和H链的V区氨基酸的种类和顺序的不同;而免疫球蛋白结合补体或巨噬细胞等生物活性,则与H链的C区有关。免疫球蛋白的主要生物活性是:与抗原的特异性结合,活化补体,与细胞如巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞、肥大细胞及嗜碱性细胞结合和抗体的选择性传递等。

(二) 抗原性和分类特征

免疫球蛋白都是大分子的物质,抗原性较复杂。轻链和重链、可变区和稳定区,由于分子结构的差异,各具有不同的特异性抗原。一般根据重链的抗原性分类,根据轻链的抗原性分型。

1. **重链的抗原性** 人体内的五类 Ig 之间的区别就在于其各自的重链氨基酸组成和抗原性不同。用小写希腊字母 γ (gamma)、 α (alpha)、 μ (mu)、 δ (delta)、 ϵ (epsilon), 分别表示 IgG、IgA、IgM、IgD 与 IgE 的两条重链。根据对重链稳定区抗原性的进一步分析, 发现 IgG、IgA 与 IgM 三类, 还可再区分为不同的亚类。如 IgG 有 4 个亚类 (IgG₁、IgG₂、IgG₃ 与 IgG₄), IgA、IgM 也可分为两个亚类 (IgA₁、IgA₂; IgM₁、IgM₂)。重链的可变区 (V) 也有抗原性, 这是因为从 N 端起约有 20 个氨基酸的排列顺序不同。据此, 可将 Ig (主要是 γ 、 δ 与 μ) 分为 4 个亚组 (VH I、VH II、VH III 与 VH IV)。

2. **轻链的抗原性** 根据轻链稳定区 (CL) 氨基酸的组成与排列顺序不同, 可将五类 Ig 的轻链分为两个抗原性, 即 κ (kappa) 型与 λ (lambda) 型。每一抗体分子中两条对称的轻链总是同型的, 不是 κ 型便是 λ 型。由于所有 Ig 的 κ 型和 λ 型轻链皆相同, 即有共同的抗原性, 因此在血清学上可出现交叉反应。此外, 各种 Ig 的抗原性还表现在: 同种 (isotype) 专一性; 同种异型 (allotype) 专一性; 个体型 (idotype) 专一性。用木瓜酶 (papain) 将 IgG 分子从重链的第 219 位氨基酸外切断, 得到 3 个片段, 两个相同的叫 Fab (fragment antigen binding), 由一条完整的轻链和一条不完整重链所组成。Fab 片段中的重链部分称为 Fb 片段, 另一个是 Fc (fragment crystallizable), 由联结重链的二硫键 C 端侧的两条不完整重链所组成。联结 Fab 和 Fc 段的 (即 CH₁ 与 CH₂ 间的狭窄区) 称为铰链区 (hinge region)。用胃蛋白酶 (pepsin) 将 IgG 分子从重链间的二硫键的 C 端侧切断, 得到了一段较大的片段 F (ab)₂, 剩余的重链部分称 Fc' 片段。Fab 和 F (ab)₂ 片段均有抗体活性; 而 Fc 与 Fc' 段则不同, 前者具有抗原性, 后者因可继续被胃蛋白酶水解为若干小片段, 因此其抗原性消失。

(三) 抗体的种类

1. 根据获得抗体的不同分类

(1) 免疫抗体: 患传染病后或经人工注射疫苗后产生的抗体、用已知抗原免疫动物产生的抗体、用单克隆抗体技术制备的抗体、近年还可用基因工程制备抗体;

(2) 天然抗体: 是指未患传染病也未注射疫苗而在体内出现的抗体;

(3) 自身抗体: 是机体对自身组织成分产生的抗体。

2. 根据抗原与抗体在试管内是否出现肉眼可见的反应进行分类

(1) 完全抗体: 此抗体能与抗原结合, 在一定条件下出现可见的抗原抗体反应;

(2) 不完全抗体: 此抗体能与相应的抗原结合, 在一定条件下不出现可见的抗原抗体反应。

(3) 完全抗体具有完全的 Ig 分子结构, 经酶水解后的片段 Fab 或 F (ab)₂, 可表现出不完全抗体的作用。不完全抗体与抗原结合后, 抗原表面便具有抗体球蛋白的特性, 如与抗球蛋白抗体作用后, 则出现可见的反应。

四、抗原与抗体的反应

抗原与抗体的反应统称为免疫学反应, 在体内进行的抗原抗体反应称为免疫反应, 在体外进行的抗原抗体反应称为血清学反应。由于抗原的物理性状不同, 参加反应的因素不同 (有的有补体或吞噬细胞参加), 因此在抗体与抗原反应时, 可表现出各种形式的反应。

1. **抗原与抗体的结合是高度特异性的结合** 抗原与抗体的结合是二者分子表面物理化学吸附现象, 抗原抗体复合物在一定的条件下可以解离。

2. **抗体结合价** 一个抗体分子有两个抗原结合点 (称两价), 在一个抗原分子上则可有多个结合点 (称为多价)。抗原与抗体分子的结合, 不受两者数量比例的限制, 但如需要出现肉眼可见的反应, 则抗原与抗体的量需保持一定比例。在抗原或抗体过量的条件下不能聚合成大颗粒, 因此不能出现肉眼可见的反应。

3. **主要的血清学反应** 有 3 个类型, 即凝集反应、沉淀反应、有补体参加的各种血清学反应。

五、抗体形成的机制

(一) 免疫反应的形成

机体在抗原物质的刺激下产生特异性免疫反应的过程,大体上可分为3个阶段:

1. **致敏阶段(加工处理抗原阶段)** 当颗粒性抗原初次进入人体内时,首先被巨噬细胞吞噬(可溶性抗原可直接被T淋巴细胞吞饮,多糖与鞭毛抗原物质可直接作用于B淋巴细胞)。通过巨噬细胞胞浆内溶酶体酶的作用,将抗原物质消化降解,而保留其抗原决定簇(特异性抗原成分)。经过加工处理的抗原分子结构比原来的小,抗原性却比原来的加强。当处理过的抗原与巨噬细胞的RNA结合成为抗原-RNA复合物(抗原信息),就具有强烈吸引免疫活性细胞的作用,能把抗原-RNA复合物传递给免疫活性细胞,启动免疫反应。

2. **反应阶段(淋巴细胞分化增殖阶段)** 免疫活性细胞在受到抗原信息的刺激后,发生母细胞化,进而大量增殖。由于抗原的性质不同,刺激胸腺依赖淋巴细胞(thymus-dependent lymphocyte,简称T细胞)分化成致敏淋巴细胞。抗原信息刺激非胸腺依赖淋巴细胞(thymus independent lymphocyte)或称骨髓衍生淋巴细胞(bone marrow derived lymphocytes,简称B细胞),使其分化成浆细胞。在分化过程中小部分成为“记忆”细胞。由于“记忆”细胞的存在,即使抗原在胞质内消失很久(数月至数年或更长),仍能与再度进入体内的相应抗原迅速引起较强的免疫反应(回忆反应)。

3. **效应阶段(发生免疫反应阶段)** 当致敏淋巴细胞再次遇到相应抗原的刺激后,能释放出多种具有生物活性的物质(淋巴因子),参与细胞免疫反应;浆细胞可形成各种类型的免疫球蛋白(抗体),参与体液免疫反应。

细胞DNA控制抗体形成的过程如下:抗原信息首先要影响到细胞DNA,再通过接受了抗原信息的DNA来控制抗体的合成。抗体球蛋白分子的合成可能有以下的方式:以DNA分子中特定的相邻核苷酸排列的顺序(遗传信息)为模板,按互补方式转录形成mRNA(信使RNA),其碱基排列反映着模板DNA信息,信使RNA由胞核进入胞浆,附着于核糖体上。接受了DNA信息的胞浆中的转移RNA(tRNA),又称可溶性RNA(sRNA),在酶的作用下携带特定的氨基酸,以核糖体上的mRNA与模板,以三联核苷酸结构特点的线形结构顺序,构成氨基酸的排列顺序,合成抗体球蛋白分子。

(二) 影响抗体产生的因素

1. **抗原的质与量** 不同性质的抗原(抗原的物理状态、生物状态及毒力强弱)对机体刺激的强弱不一,表现为抗体形成速度的快慢不一,抗体持续的时间长短不一。有些处于可溶性状态的抗原其抗原性强,被吞噬细胞处理后抗原性差,而另一些抗原则与此相反。一般初次菌体抗原刺激,2~5d出现抗体,初次类毒素刺激,2~3周出现抗体。使用的抗原量不同影响也不同,活菌(减毒株)用量少,死菌用量多;死菌用强毒性的抗体反应好。在一定范围内,抗原增多,抗体反应量增加,但抗原量过多,超过了一定限度,抗体反应量就会受到抑制,这称为免疫麻痹(immunologic paralysis)。

2. 机体因素

(1) **免疫途径** 免疫途径不同,抗原在体内滞留的时间不同,抗原接触机体的免疫组织也不同。抗原在体内停留时间久者,抗体反应高。局部使用,仅引流抗原的局部淋巴结中产生抗体;粘膜表面使用,常在粘膜下淋巴细胞组织或细胞中形成抗体;静脉内注入抗原则引起广泛的产生抗体的组织反应,但抗原中的毒性物质常可引起严重反应。静脉内注入抗原,只适用于急用动物血清。

(2) **免疫次数及间隔** 初次免疫,抗体出现慢、效价低、持续时间短,为建立基础免疫,至少应在一定间隔时间内连续的免疫2~3次,如死疫苗一般需间隔7~10d,免疫3次。类毒素免疫需间隔4周,免疫两次。一般免疫效果可保持数月至1年。用动物制造抗血清蛋白等抗体时,追加免疫注射,注射剂量、途径、间隔均需严加注意,以免动物发生变态反应死亡。

(3) **机体处于发育的不同阶段**,免疫细胞对抗原刺激的反应不同。根据动物实验资料,可将免疫反

应分为3级,在胚胎期及新生儿早期,抗原可使胚胎早期的免疫活性细胞全部消灭或部分抑制,称为0级反应。生产后的动物不再对该同一抗原发生反应,动物形成免疫耐受 (immunologic tolerance)。出生后,抗原刺激则引起免疫活性细胞增生,形成细胞免疫反应,称为Ⅰ级反应。出生后经过一段时间才引起浆细胞增生,伴随抗体形成,称为Ⅱ级反应。

3. 佐剂 (adjuvants) 的作用 佐剂有增强免疫作用,佐剂伴随抗原物质注射机体,可增强抗原的作用,佐剂可使弱抗原物质成为有效的抗原。如明矾沉淀类毒素可刺激免疫活性细胞增殖,推迟抗原吸收排除,使抗原在体内持续较久。油剂、结核菌、卡介菌、蜡质等可广泛地刺激吞噬细胞的吞噬作用,刺激不成熟的浆细胞及淋巴细胞,产生较好的免疫效果。佐剂又称免疫增强剂,种类很多,实验室常用福氏佐剂、明矾和氢氧化铝等。明矾和氢氧化铝的作用是吸附抗原以延缓吸收,使抗原刺激得以持久;并刺激局部生成浆细胞,增加抗体生成。福氏佐剂 (Freund's adjuvants) 中羊毛脂类物质和石蜡油均能延缓抗原的吸收、裂解与消除,使抗原的刺激持久;抗酸杆菌能引起淋巴结、脾、肌肉中广泛增生浆细胞,提高抗体生成;石蜡油对刺激网状内皮系统有协同作用。完全福氏佐剂的配制是:取 200mg 卡介菌加入高压灭菌的优质石蜡油 85ml 和羊毛脂 15ml 中,用无菌注射器或振动混合器混匀。不完全福氏佐剂只用石蜡油和羊毛脂混合液,不加入卡介菌。佐剂与可溶性抗原水溶液一般用等体积混合,如福氏佐剂与等量球蛋白溶液混合,用注射器或振动混合器充分混合,取一小滴滴于水面 (4℃~8℃) 上,若不散开保持滴状,即可应用。

六、补体系统

补体系统 (complement system) 是存在于人和动物正常血清中、具有酶活性的一组复杂的血清蛋白。由球蛋白、碳水化合物与磷脂结合而成,约占血清球蛋白总量的 10%,不耐热,加热至 56℃ 经 30min 即被灭活。补体参与多种抗原抗体反应,导致细菌、红细胞等溶解。但此种作用不是特异性的,补体能与任何抗原抗体的复合物结合而发生反应。近年的研究表明补体不仅是机体自身稳定和保护性反应的重要物质之一,而且还参与许多免疫病理的损伤机制。

补体系统由 9 个成分 11 种血清蛋白质组成,常以符号 "C" 表示。根据其作用顺序分别命名为 C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8 和 C9。其中 C1 又由 3 个亚单位所组成,即 C1q、C1r 和 C1s。C1~C9 代表活化的补体成分。所有补体成分均为大分子蛋白质,除 C1q 外,皆以不活动形式存在于血清中。

补体的各种成分由体内不同部位合成,C1 由胃肠道上皮细胞合成,C2 与 C4 由巨噬细胞合成,C3 主要在肝脏合成,C6、C9 也可能在肝脏合成。

当因某种原因被补体激活时,补体成分便按两种激活途径即 C1 激活途径和 C3 激活途径,按一定的顺序呈现连锁的酶促反应,参与机体的防御功能和维持自稳状态;亦可作为一种介质或效应物质参与机体的免疫病理过程。

第二节 免疫荧光细胞化学的基本原理

用荧光抗体示踪或检查相应抗原的方法称荧光抗体法;用已知的荧光抗原标记物示踪或检查相应抗体的方法称荧光抗原法,这两种方法统称免疫荧光技术,以荧光抗体方法较常用。免疫荧光细胞化学分直接法、夹心法、间接法和补体法。

一、直接法

1. 检查抗原法 这是最早的方法,用已知特异性抗体与荧光素结合,制成荧光特异性抗体,直接与细胞或组织中相应抗原结合,在荧光显微镜下即可见抗原存在部位呈现特异性荧光。此法很特异和简

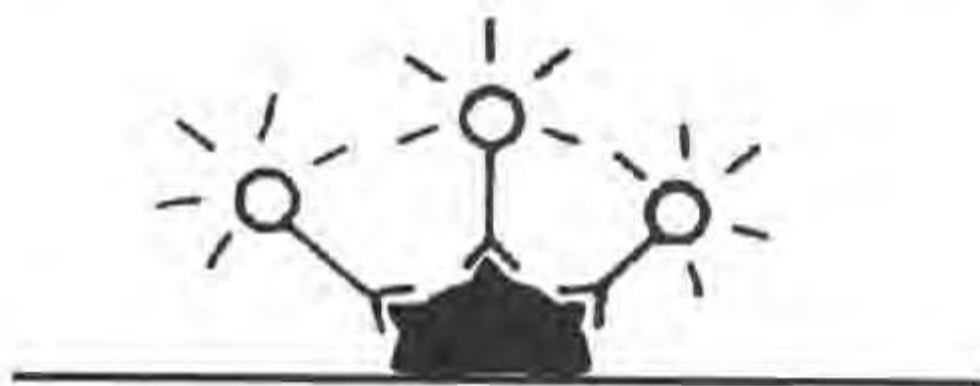


图 26-1 直接法

原的特异性荧光抗体与结合在细胞内抗体上的抗原相结合，抗原夹在细胞抗体与荧光抗体之间，故称夹心法（图 26-2）。

2. 检查抗体法 用已知抗原细胞或组织标本的切片，加上待检血清，如果其中含有切片中某种抗原的抗体，抗体便沉淀结合在抗原上，再用间接荧光抗体（抗种属特异性 IgG 荧光抗体）与结合在抗原上的抗体反应（如检测人血清中的抗体必须用抗人 IgG 荧光抗体等），在荧光显微镜下可见抗原抗体反应部位呈现明亮的特异性荧光。此法是检验血清中自身抗体和多种病原体抗体的重要手段。

3. 检查抗原法 此法是直接法的重要改进，先用特异性（对细胞或组织内抗原）抗体（或称第一抗体）与细胞标本反应，随后用缓冲盐水洗去未与抗原结合的抗体，再用间接荧光抗体（也称第二抗体，种属特异性）与结合在抗原上的抗体（是第二抗体的抗原）结合，形成抗原-抗体-荧光抗体的复合物。由于结合在抗原抗体复合物上的荧光抗体显著多于直接法，从而提高了敏感性。如细胞抗原上每个分子结合 3~5 个分子抗体，当此抗体作为抗原时又可结合 3~5 分子的荧光抗体，所以和直接法相比荧光亮度可增强 3~4 倍。此法除灵敏性高外，它只需要制备一种种属间接荧光抗体，可以适用于多种第一抗体的标记显示。这是现在最广泛应用的技术。

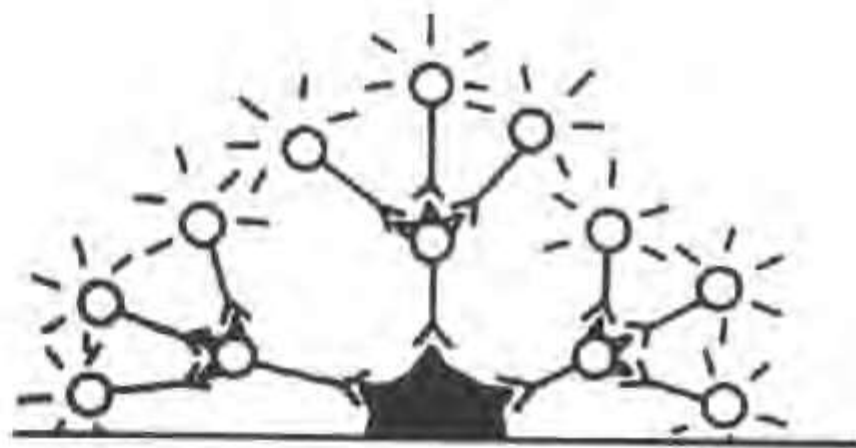


图 26-2 间接法

三、补体法

1. 直接检查组织内免疫复合物法 用抗补体 C3 等荧光抗体直接作用组织切片，与其中结合在抗原抗体复合物上的补体反应，而形成抗原抗体补体复合物-抗补体荧光抗体复合物，在荧光显微镜下呈现阳性荧光的部位就是免疫复合物的存在处。此法常用于肾穿刺组织活检诊断等。

2. 间接检查组织内抗原法 常将新鲜补体与第一抗体混合同时加在抗原标本切片上，经 37℃ 孵育后，如发生抗原补体抗体反应，补体就结合在此复合物上，再用抗补体荧光抗体与结合的补体反应，形成抗原抗体-抗补体荧光抗体的复合物，此法优点是只需一种荧光抗体可适用于各种不同种属来源的第一抗体的标记显示（图 26-3）。

四、双重免疫荧光标记法

在同一细胞组织标本上需要同时检查两种抗原时，要进行双重荧光染色，一般均采用直接

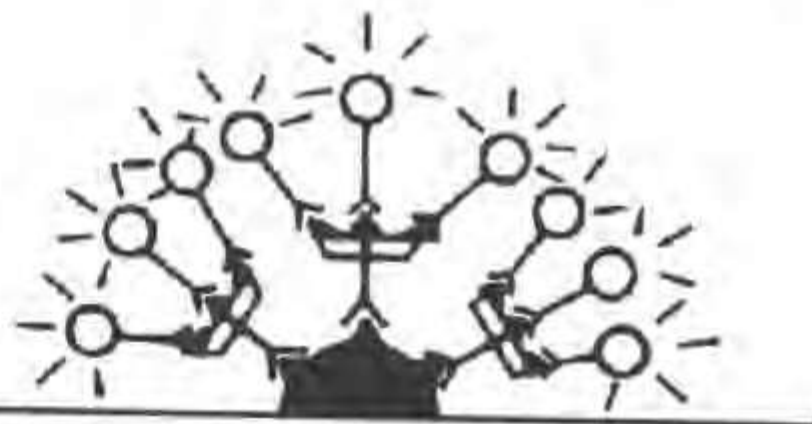


图 26-3 补体法

便，但一种荧光抗体只能检查一种抗原，敏感性较差（图 26-1）。

2. 检查抗体法 将抗原标记上荧光素，即为荧光抗原，用此荧光抗原与细胞或组织内相应抗体反应，而将抗体定位检测出来。

二、间接法

1. 检查抗体法（夹心法） 此法是先由特

法。将两种荧光抗体（如抗 A 和抗 B）以适当比例混合后加在标本上孵育，按直接法洗去未结合的荧光抗体，抗 A 抗体用异硫氰酸荧光素标记，发黄绿色荧光；抗 B 抗体用 TMRITC 或罗丹明标记，发红色荧光，可以明确显示两种抗原的定位。

五、对照实验

为了保证免疫荧光细胞化学染色的准确性，排除某些非特异性染色，必须在初次试验时进行以下对照试验：

1. 直接法 须设下述对照试验：

(1) 标本自发荧光对照 标本只加 PBS 或不加 PBS，缓冲甘油封片，荧光显微镜观察应呈阴性荧光（无与特异性荧光相似的荧光）。

(2) 抑制试验 可分为二步法和一步法。

①二步抑制法：标本先加未标记的特异性抗体，再加标记荧光抗体，结果应呈阴性或明显减弱的荧光；

②一步抑制法：先将荧光抗体用未标记抗体作适量混合，再加在标本上染色，结果应为阴性。此法效果较二步法好，并且简便。

(3) 阳性对照 用已知阳性标本作直接法免疫荧光染色，结果应呈阳性荧光。

如对照 (1) 和 (2) 无荧光或弱荧光，(3) 和待检查标本呈强荧光即为特异性阳性荧光。

2. 间接法

(1) 自发荧光对照 同上 (1)。

(2) 荧光抗体对照 标本只加间接荧光抗体染色，结果阴性。

(3) 抑制试验 同上。

(4) 阳性对照 同上。

如对照 (1)、(2)、(3) 均呈阴性，阳性对照和待检标本阳性则为特异性荧光。

3. 补体法

(1) 自发荧光对照

(2) 荧光抗体对照

(3) 抑制试验

(4) 补体对照 取新鲜豚鼠血清 1:10 稀释先作用标本，再用抗补体荧光抗体染色，结果阴性。

(5) 抑制试验 标本加灭活的第一抗体，用 1:10 稀释度的新鲜豚鼠血清孵育后，再加未标记的抗补体血清与抗补体荧光抗体等量混合稀释液，结果应为阴性。

(6) 阳性对照 (1) ~ (5) 结果阴性，(6) 和待检标本阳性时，则为特异性荧光。

第三节 荧光抗体的制备

荧光抗体是免疫荧光细胞化学的重要技术之一，制备高特异性和高效价的荧光抗体必须选用高质量的荧光素和高特异性、高效价的免疫血清。

一、荧光素

荧光是指一个分子或原子吸收了给予的能量后即刻引起发光，停止能量供给，发光也瞬时停止（一般持续 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ s）。可以产生明亮荧光的染料物质，称荧光色素，目前主要常用的荧光色素有以下 3 种：

1. 异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate, FITC）呈黄色、橙黄或褐黄色粉末或结晶，性质稳定，在室温下能保存 2 年以上，在低温中可保存多年。易溶于水和酒精。最大吸收光谱为 490~495nm，最大发射光谱为 520~530nm（图 26-4），呈现黄绿色荧光，分子量为 398.4。

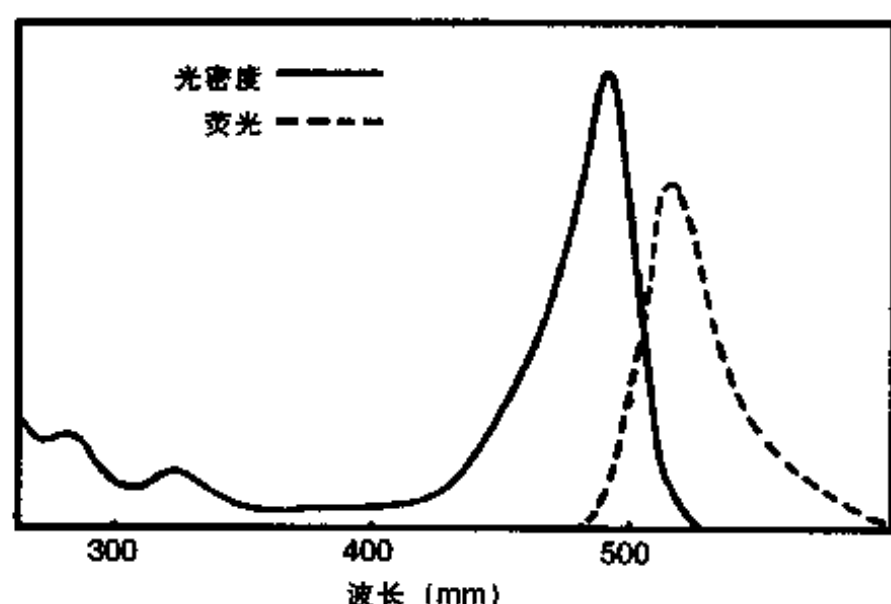


图 26-4 FITC 的吸收光谱和发射光谱

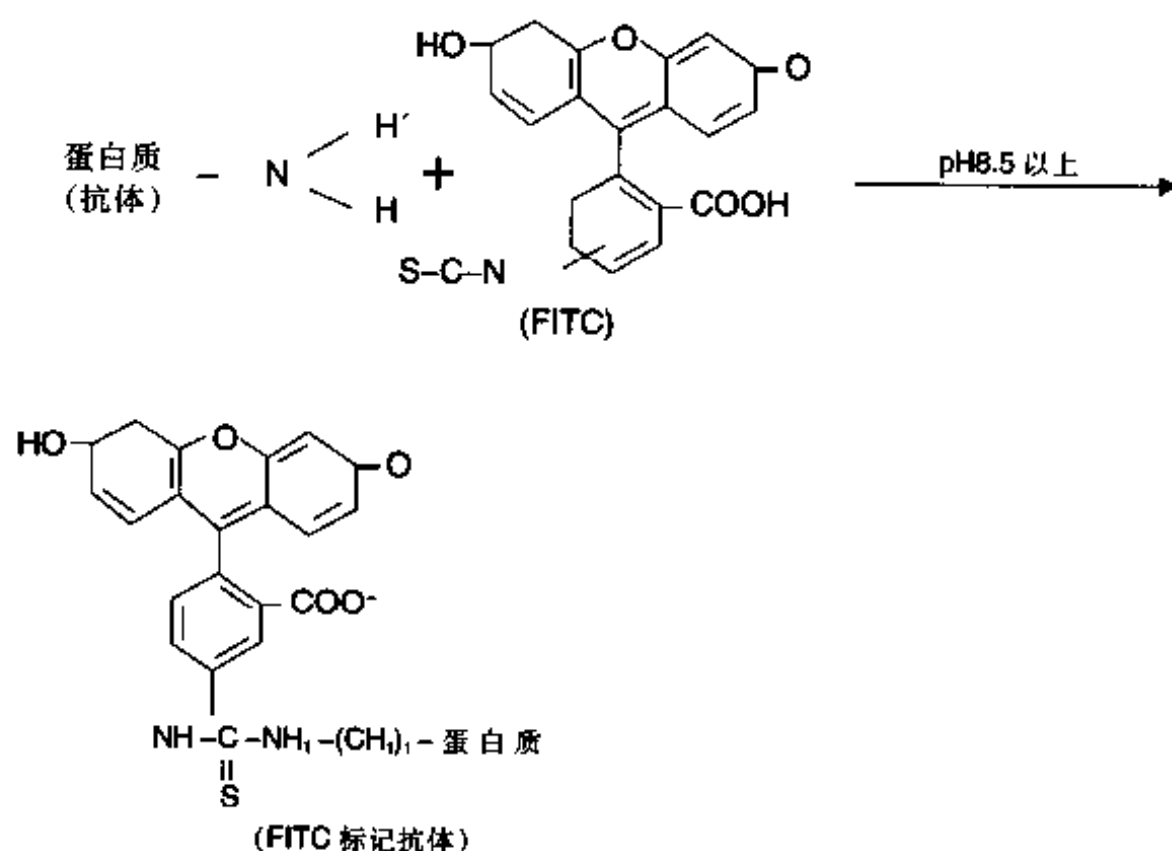


图 26-5 抗体的 FITC 标记反应式

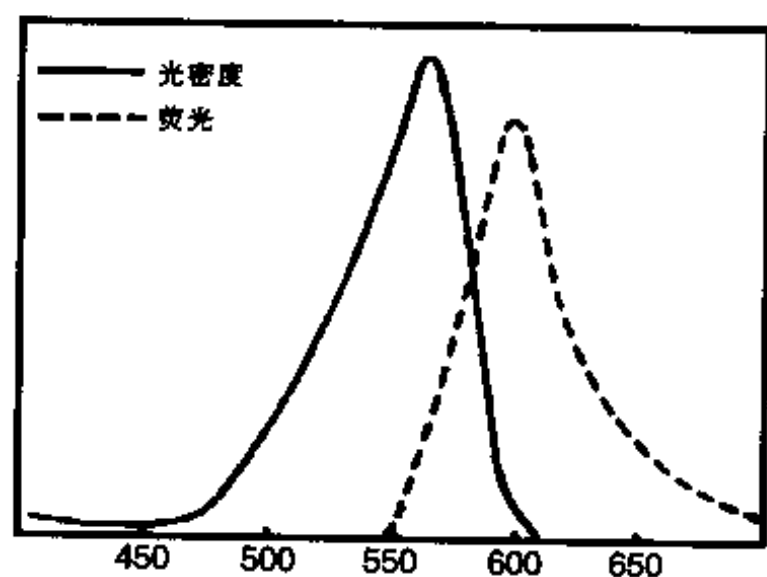


图 26-6 RB200 在可见光区的吸收光谱和荧光光谱

在碱性条件下, FITC 的异硫氰酸基在水溶液中与免疫球蛋白的自由氨基经碳酰胺化而形成硫碳氨基键, 成为标记荧光免疫球蛋白, 即荧光抗体。反应式如下 (图 26-5): 一个 Ig 分子上最多能标记 15~20 个 FITC 分子。

2. 四乙基罗丹明 (tetraethylrhodamine B200, RB200) 分子量为 580, 呈褐红色粉末, 不溶于水, 易溶于酒精和丙酮, 性质稳定, 可长期保存。最大吸收光谱为 570nm, 最大发射光谱为 595~600nm, 呈明亮橙红色荧光 (图 26-6)。RB200 在五氯化磷 (PCl_5) 作用下转变成磺酰氯 (SO_2Cl), 在碱性条件下易与蛋白质的赖氨酸 ϵ -氨基反应结合而标记在蛋白分子上。化学反应式如图 26-7。

3. 四甲基异硫氰酸罗丹明 (tetramethylrhodamine isothiocyanate, TMRITC) 它是一种紫红色粉末, 较稳定。其最大吸收光谱为 550nm, 最大发射光谱 620nm, 呈橙红色荧光, 与 FITC 的黄绿色荧光对比清晰 (图 26-8), 与蛋白质结合方式同 FITC。它可用于双标记示踪研究。化学结构式如图 26-9。

二、荧光素标记抗体的方法

1. FITC 标记抗体的方法

(1) Marshall 法

①材料: 抗体球蛋白溶液、0.5mol/L pH9.0 碳酸盐缓冲液、无菌生理盐水、

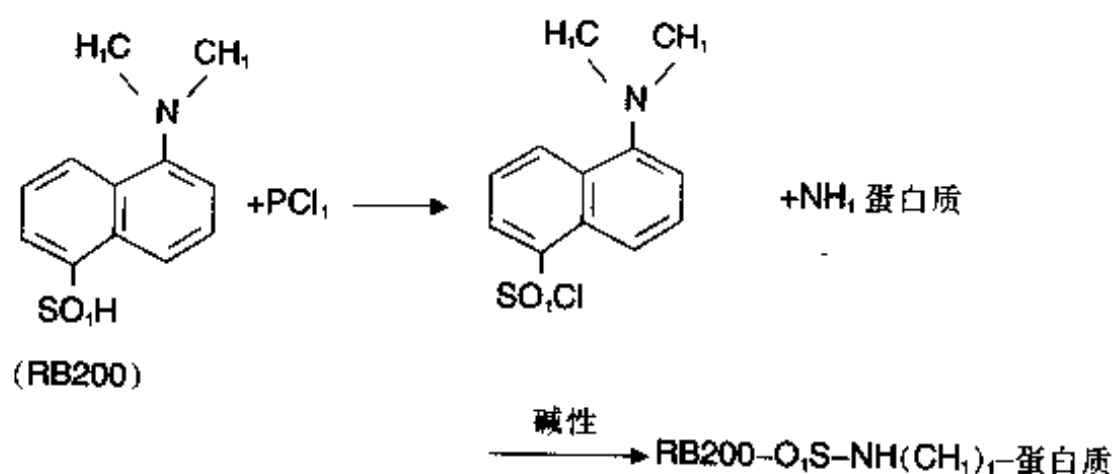


图 26-7 RB200 标记抗体反应

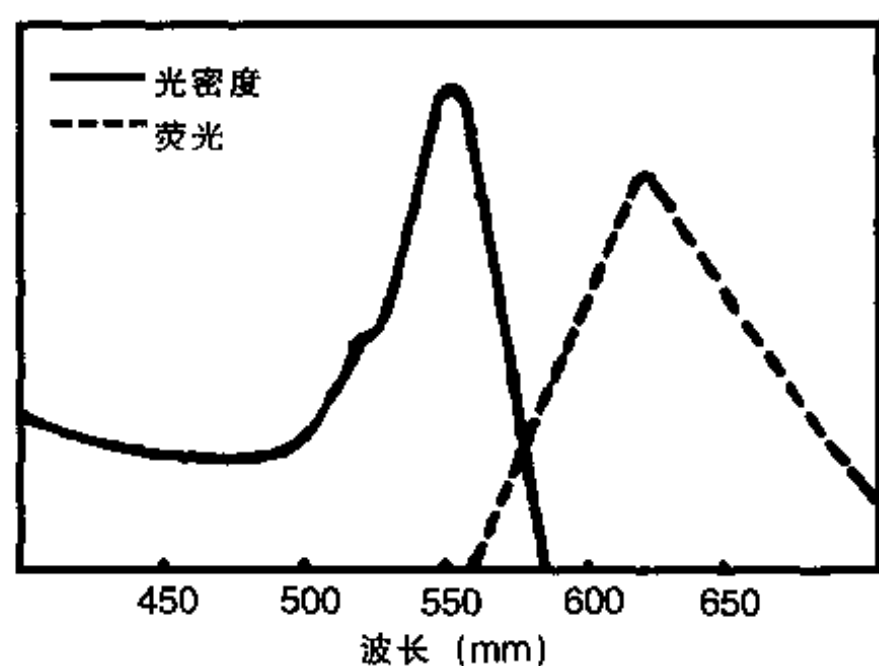


图 26-8 TMRITC 在可见光区的吸收光谱和发射光谱

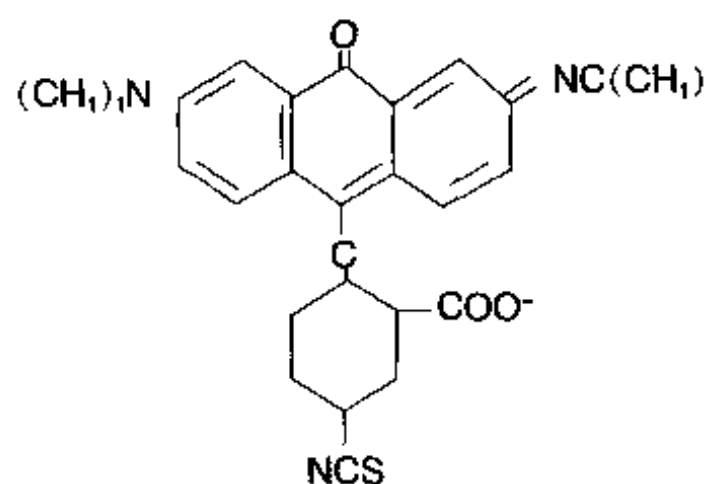


图 26-9 TMRITC 结构式

(0℃~4℃) 过夜。过柱：取透析过夜的标记物，过葡聚糖凝胶 G-25 或 G-50 柱，分离游离荧光素，收集标记的荧光抗体进行鉴定 (图 26-10, 图 26-11)。

③洗脱液：0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH7.2)。过滤量：12ml 标记球蛋白液 (过滤前未透析)；收集量：20 ml (稀释 1.7 倍)。分别以 1mg FITC 溶于 2 份 1ml 0.5mol/L 碳酸重碳酸盐缓冲液 (分别为

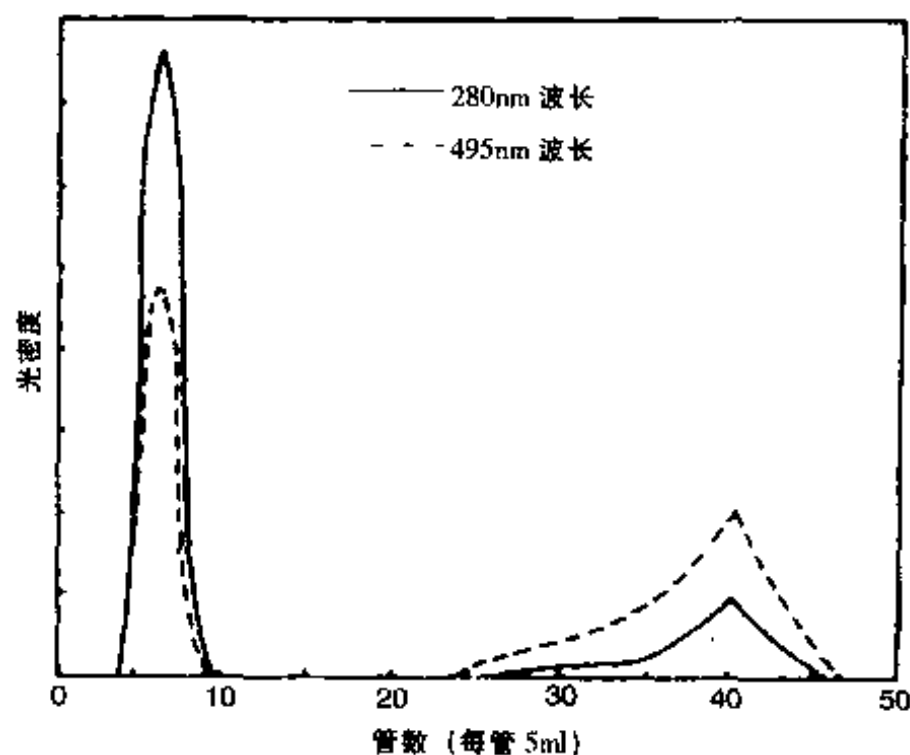


图 26-10 Sephadex G-25 对 FITC

异硫氰酸荧光素、1%硫柳汞水溶液、三角烧瓶 (25~50ml)、冰及冰槽 (或 1 000ml 烧杯)、电磁搅拌器、灭菌吸管、透析袋、玻棒、棉线及烧杯 (500ml)、pH7.2 或 8.0 的 0.01 mol/L PBS 等。

②方法及步骤：抗体的准备：取适量已知球蛋白浓度的溶液，置入三角烧瓶中，加入生理盐水及碳酸盐缓冲液，使最后蛋白浓度为 20mg/ml，缓冲液容量为总量的 1/10，混匀，将三角烧瓶置冰槽中，电磁搅拌 (速度适当以不起泡沫为宜) 5~10min。荧光素的准备：根据欲标记的蛋白质总量，按每毫克蛋白加 0.01mg 荧光素，用分析天平准确称取所需的异硫氰酸荧光素粉末。结合 (或称标记)：边搅拌边将称取的荧光色素渐渐加入球蛋白溶液中，避免将荧光素粘于三角烧瓶壁或搅拌玻棒上 (大约 5~10min 内加完)，加毕后，继续搅拌 12~18 h。结合期间应保持蛋白溶液于 4℃左右，故需及时添冰去水；亦可将结合装置安放在 4℃冰箱或冰库中。透析：结合完毕后，将球蛋白的溶液离心 (2 500rpm) 20min，除去其中少量之沉淀物，装入透析袋中后再置于烧杯中，用 pH 8.0 缓冲盐水透析

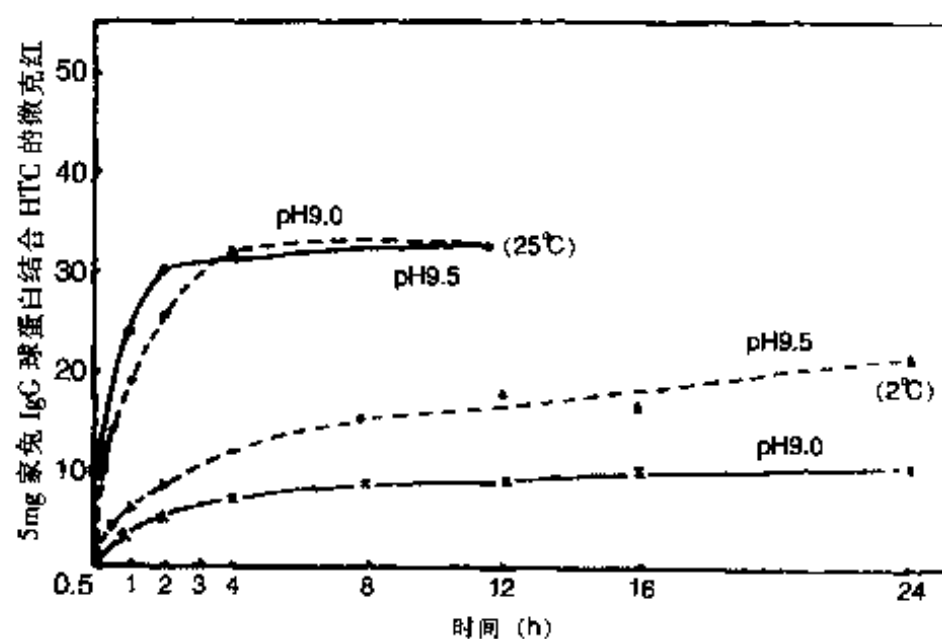


图 26-11 FITC 与家兔 IgG 球蛋白在 25℃和 2℃时结合的动力学 (Kawamura 1964)

pH9.5 和 pH9.0), 于 2℃ 下搅拌, 将其各加入 100 mg 家兔 IgG 生理盐水溶液中, 搅匀后立即将每份分为两半, 一半保留于 2℃ 下, 另一半置于 25℃ 下。间隔一定时间后各取出 0.5ml 通过 sephadex G-25 去除游离 FITC, 由上计算出 5mg 家兔 IgG 结合的 FITC 量。

(2) Chadwick 法

①材料: 抗原球蛋白溶液、异硫氰酸荧光素、3%碳酸氢钠水溶液、0.01mol/L pH8.0 磷酸盐缓冲盐水、1%硫柳汞、离心机及离心管、三角烧瓶 (25ml)、冰槽、无菌吸管及毛细滴管、烧杯 (500ml)、透析袋、棉线、玻棒等。

②方法及步骤: 抗体准备: 用 0℃~4℃ pH8.0 磷酸盐缓冲盐水将球蛋白溶液稀释至浓度为 30~40mg/ml, 置入三角烧瓶内, 放于冰槽中。荧光色素准备: 按每毫克蛋白加入荧光素 0.01mg 计算, 称取所需之荧光素量, 用 3%碳酸氢钠水溶液溶解。将准备的抗体与荧光色素溶液等量混合, 充分搅匀, 在 0~4℃ 冰箱中结合 18~24h。透析和柱层析: 方法同 Marshall 氏法。

(3) 改良法

根据 Marshall 法取高价的抗人球蛋白免疫血清, 分离球蛋白, 用盐水 (0.15mol/L NaCl) 及缓冲液 (0.15mol/L NaHCO_3 - Na_2CO_3 pH9.0) 稀释, 使每毫升内含蛋白 10mg, 缓冲液为总量的 10%, 降温至 4℃, 加入异硫氰酸盐荧光素 [蛋白:荧光素 = (50~80):1], 在 0℃~4℃ 下电磁搅拌 12~14h, 然后用半饱和硫酸铵将标记球蛋白沉淀分离, 除去未结合的荧光素, 再用缓冲盐水透析, 除去硫酸铵 (用 Nessler 氏试剂测验至隔夜透析之盐水无氨离子及荧光色素为止)。将制备好的荧光抗体加叠氮钠 0.01%, 分装在 1ml 安瓿中或冻干保存于冰箱中 (4℃) 可以用半年以上, -20℃ 保存可达 2 年以上。

【附一】0.01mol/L pH7.2 PBS 配法: NaCl 18g, Na_2HPO_4 1.5g, KH_2PO_4 0.2g, 溶于 2000ml 蒸馏水中, 校定 pH 至 7.2。

【附二】0.5mol/L pH9.0 碳酸盐缓冲液配法: 取 0.5mol/L Na_2CO_3 (5.3%) 10ml 加入 0.5mol/L NaHCO_3 (4.2%) 90ml, 混合后, 校定 pH 至 9.0。

【附三】3%碳酸氢钠水溶液配法: 称 1.5g 无水碳酸氢钠充分溶解于 50ml 灭菌蒸馏水中即成。

(4) 透析标记法

此法适用于小量抗体的荧光素标记, 标记简便, 非特异性染色较少。主要步骤如下: ①用 pH9.0 的 0.025mol/L 碳酸盐缓冲液, 将欲标记免疫球蛋白稀释成 1% 浓度, 装入透析袋中; ②用同一缓冲液将 FITC 配成 0.1mg/ml 的溶液, 按 1% 球蛋白液体体积的 10 倍将 FITC 稀释液盛于圆柱形容器内, 并使透析袋浸没于 FITC 液中。容器顶端盖紧, 底部放搅拌棒, 在 4℃ 电磁搅拌下透析标记 24h。取出透析袋中标记液, 即刻用 sephadex G-50 凝胶过滤, 去除游离荧光素, 分装, 贮存于 4℃ 中 (图 26-12)。

2. 四乙基罗丹明标记抗体方法 取 1g RB200 及 PCL5 2g 放在乳钵中研磨 5 min (在通风橱中)。然后加入 10 ml 无水丙酮, 放置 5 min, 不断搅拌。过滤后用滤液进行标记抗体。剩余部分吸附在滤纸上, 4℃ 干燥保存。

取抗体 (20 mg/ml) 每毫升加入生理盐水和

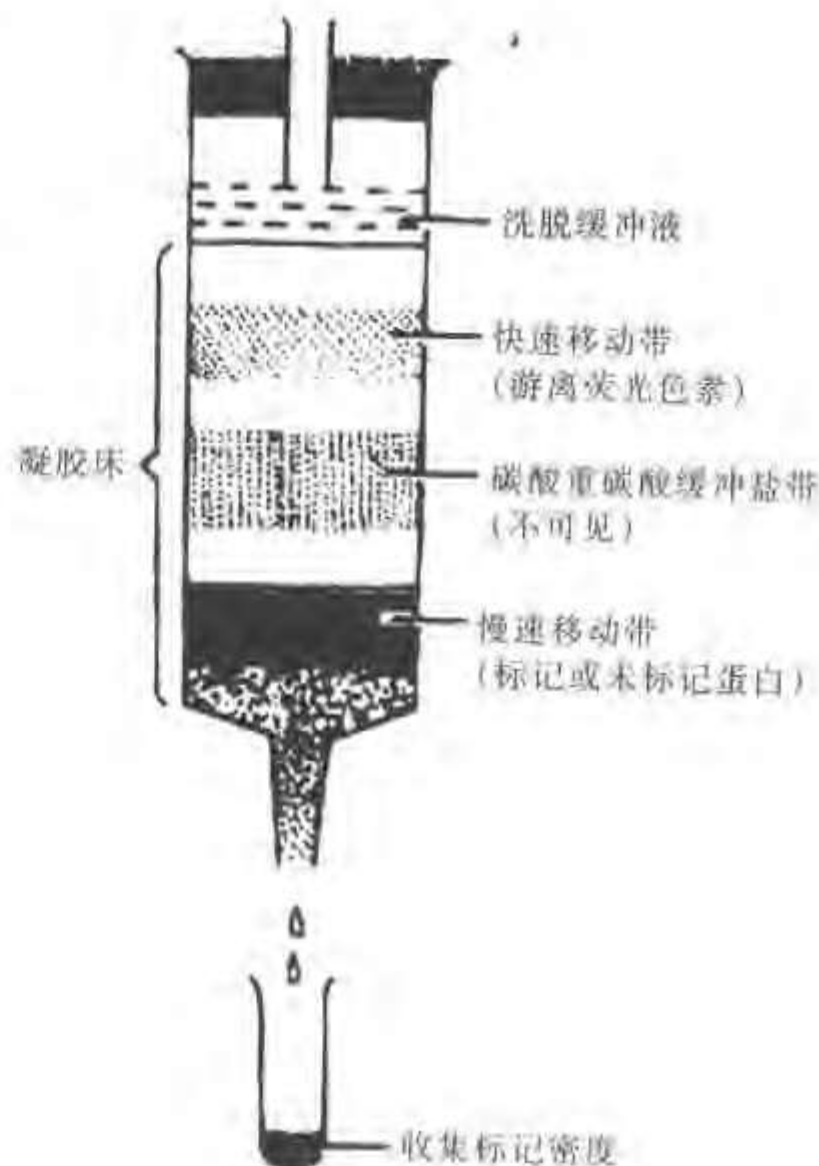


图 26-12 标记抗体溶液通过 sephadex 产胶柱层析分布

0.5 mol/L pH 9.0 的碳酸盐缓冲液各 1 ml 稀释。逐滴加入 0.1 ml RB200 溶液, 边加入边搅拌, 在 0℃~4℃ 中结合 12~18 h, 再用生理盐水透析 5~7 h, 经葡聚糖凝胶 G-50 柱层析, 除去游离荧光素, 分装, 贮存于 4℃ 备用。

3. 四甲基异硫氰酸罗丹明标记抗体方法

(1) IgG 10 ml (6 mg/ml) 在 0.01 mol/L pH 9.5 碳酸盐缓冲液中透析过夜。

(2) 将四甲基异硫氰酸罗丹明 (每毫克 IgG 加入 5~20 μg) 溶于二甲亚砜 (1 mg/ml), 取此溶液 300 μl, 一滴一滴加入蛋白质溶液中, 同时电磁搅拌。

(3) 在室温中搅拌 2 h, 避光。

(4) 把结合物移入直径 3 cm、高 30 cm 大小的 Bio-Gel P-6 层析柱 (用 0.01 mol/L pH 8.0 的 PBS 平衡过), 流速为 1.5 ml/min。

(5) 收集先流出的红色结合物, 即为标记抗体, 分装, 4℃ 保存备用。

4. 藻红蛋白标记抗体的方法

(1) 巯基化藻红蛋白 (phycoerthrin, PE) 的制备, 600 μl 的 15.5 mg/ml 盐酸巯醇亚胺 (iminethiolane hydrochloride) 加到 1.2 ml 的 3.6 mg/ml 的 PE 中, 与 pH 6.8 1.2 ml PB 混合, 装入透析袋置入 50 mmol/L pH 6.8 PB 中透析, 4℃ 过夜, 再换用 pH 7.5 PB 透析 6 h。每个 PE 分子中可结合 8 个巯基。

(2) PE-IgG 制备 异双功能试剂 SPDP [N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate] 30 μl (1.1 mg/ml) 的乙醇溶液, 加入 700 μl 的 4.2 mg/ml IgG PB 溶液 (50 mmol/L pH 7.5), 在室温中反应 2.5 h。再加入巯基化 PE 400 μl (1.7 mg/ml) 加到 500 μl 反应混合液中, 室温反应 12 h, 加入 100 μl 的 50 mmol/L 碘乙酸钠封闭残余巯基, 用 PB 透析过夜, 4℃。加入 0.01% Na₃N₃ 分装, 4℃ 保存半年。

5. PE-标记蛋白 A 方法

(1) 取 4.08 mg PE 溶于 0.1 mol/L pH 7.4 PB (含 0.1 mol/L NaCl) 1 ml 中, 溶解后, 取出 0.5 ml, 再加入 10 μl SPDP 无水甲醇液 (2.65 mg/ml), SPDP/蛋白的摩尔比为 10, 22℃ 反应 5 min, 过 Sephadex G-50 (1 cm×17 cm), 用 100 mmol/L pH 7.4 PBS (含 0.1 mol/L NaCl) 平衡和洗脱。

(2) 0.5 ml 蛋白 (2 mg/ml) 0.1 mmol/L PB (含有 0.1 mmol/L NaCl) pH 7.4, 加入 2.6 μl 上述 SPDP 甲醇液, SPDP: 蛋白=9.5, 22℃, 40 min, 加入 25 μmol/L 二巯苏糖醇 (DTT) pH 7.4 缓冲液, 22℃, 25 min, 同上过 Sephadex G-50, 收集蛋白 A 峰。

(3) 取 0.77 mg/ml 的 PE 和 0.27 mg/ml 蛋白 A 等量混合, 22℃ 反应 6 h, 混合物 4℃ 保存备用。

以上两种 PE 标记制品, 可最后溶于 0.01 mol/L pH 7.4 PB (含有 0.1 mol/L DETA、1 mol/L 碘乙酰胺、1% BSA 和 0.1% NaN₃), 0~5℃ 保存。

6. 蓝色荧光素标记抗体方法 Khaffan 等 (1986) 首先创立了蓝色荧光素标记和染色技术, 可进行双标记或多标记。

(1) 取 7-氨基-4-甲基香豆素 (7-amino-4-methyl coumarin, AMC) 260 μg 溶于二甲亚砜 25 μl 中。

(2) 将上液加入 10 ml IgG 的巴比妥缓冲液中 (0.5 mol/L, pH 8.5, 内含 50~100 mg IgG), 室温反应 2 h, 过 Sephadex G-50 除去游离荧光素。

AMC 呈黄色结晶固体, 最大吸收波长 354 nm, 最大荧光波长 430 nm。

三、荧光抗体质量控制

对制备的荧光抗体必须进行质量鉴定, 主要进行特异性和敏感性两个方面的鉴定。

1. 染色特异性和敏感性的测定

(1) 特异性染色效价的测定 直接染色以倍比稀释荧光抗体溶液如 (1:2, 1:4, 1:8……) 与相应抗原标本作一系列染色, 荧光强度在 “+++” 的最大稀释度, 即为该荧光抗体的染色滴度 (效价) 或单位。实际染色应用时, 可取低一个或两个稀释度 (即 2~4 个单位), 如染色效价为 1:64, 实际应用时可取 1:

32 或 1:16。间接染色效价可按抗核抗体荧光染色法步骤,先用不同稀释度的荧光抗体染色,结果以抗核抗体荧光强度“++”为标准,染色用效价和直接法相同。

(2) 非特异性染色测定 根据荧光抗体的用途不同,可用相类似的抗原切片或涂片,倍比稀释荧光抗体,按常规染色,结果在标本上出现的非特异染色应显著低于特异染色滴度,否则应采取消除非特异性染色的方法处理荧光抗体。

(3) 吸收试验 在荧光抗体中加入过量相应抗原,于室温中搅拌 2 h 后移入 4℃ 中过夜,3000 rpm,离心 30 min,收集上清液,再用以染相应抗原阳性标本,结果应不出现明显阳性荧光。

(4) 抑制试验 如前述。

2. F/P 比值的测定 F (荧光素) 和 P (抗体蛋白) 的克分子比值反映荧光抗体的特异性染色质量,一般要求 F/P 的克分子比值为 1~2。过高时,非特异性染色增强;过低时,荧光很弱,降低敏感性。

(1) 蛋白质定量 测定荧光抗体的蛋白质 mg/ml 量。

(2) 结合荧光素定量 先制作荧光素定量标准曲线,即准确称取 FITC 1mg,溶于 10 ml 0.5 mol/L pH 9.0 碳酸盐缓冲液中,再用 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 稀释到 100 ml,此时荧光素含量为 10 μg/ml,以此为原液,再倍比稀释 9 个不同浓度的溶液,用分光光度计在 490 nm 波长测定光密度值 (OD),以光密度为纵坐标,荧光素含量为横坐标,作标准函数图。

荧光素与蛋白质结合后,其吸收光谱峰值向长波方向位移约 5 nm, FITC 和蛋白质结合后由 490 nm 变为 493~495 nm, RB200 和蛋白质结合后变为 595 nm。

F/P 比值的计算:可按以下公式计算。

$$\text{F/P 克分子比值} = \frac{\text{FITC } \mu\text{g/ml}}{\text{蛋白质 mg/ml}} \times \frac{160\,000 \times 10^3}{390 \times 10^6} = 0.41 \times \frac{\text{FITC } \mu\text{g/ml}}{\text{蛋白质 mg/ml}}$$

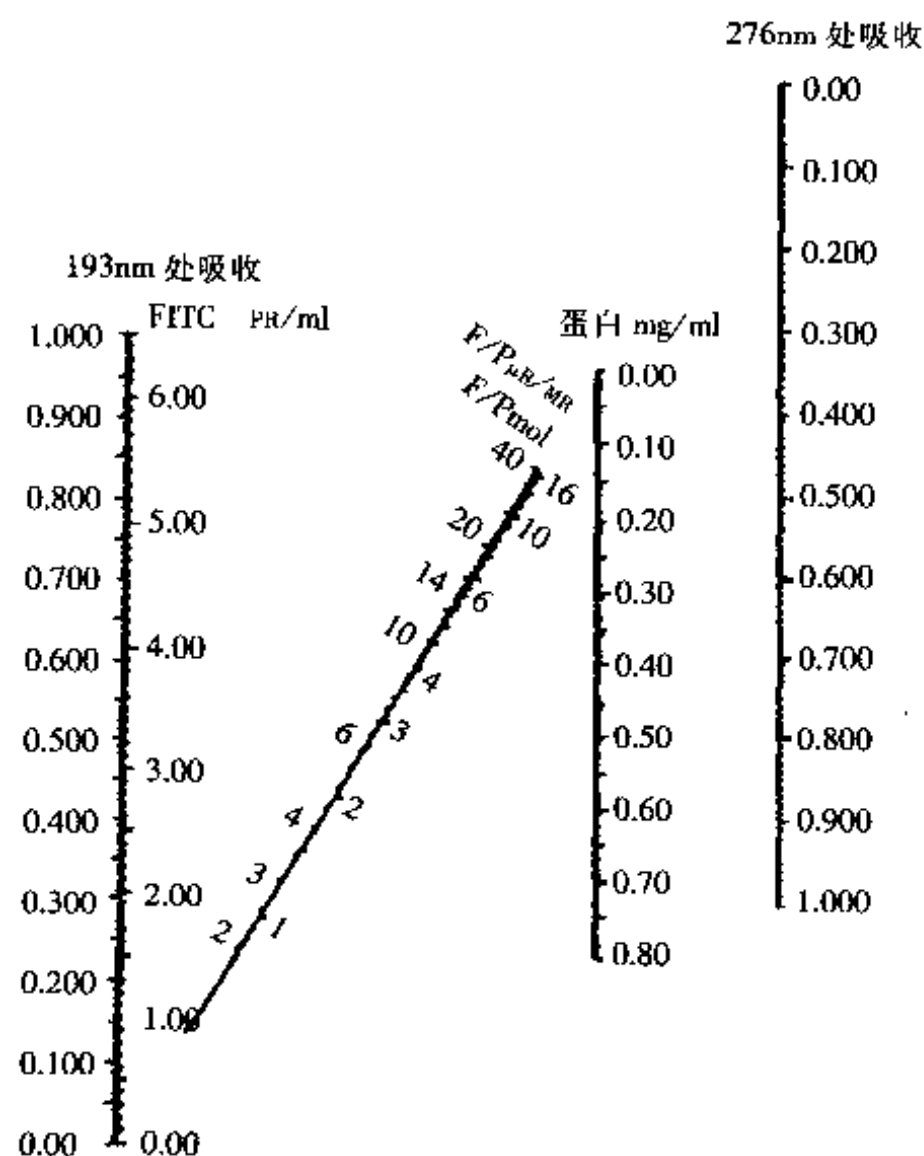


图 26-13 FITC 标记物中球蛋白、荧光色素和 F/P 比值计算图

式中 160 000 为抗体蛋白质的分子量, 390 为 FITC 的分子量。蛋白质从克换算为毫克需再乘以 10^3 , 而荧光素从克换算为微克需要再乘以 10^6 。

测定 RB200 荧光抗体的摩尔比值公式如下:

$$\text{RB200 荧光抗体摩尔比值} = \frac{(\text{RB200} \mu\text{g/ml} \times 10^{-3}) \div 580}{\text{蛋白质 mg/ml} \div 160\,000 (\text{IgG})}$$

$$\text{TMRPTC 荧光抗体摩尔量比值} = \frac{A_{515\text{nmOD}}}{A_{280\text{nmOD}}} \text{ 或 } = \text{重量比 (g/g)} \times \frac{160\,000}{580}$$

按图 26-13 测定法更为简便, 即先用 276 nm 波长测得蛋白质的 OD 值, 再用 493 波长测得 FITC 的 OD 值, 将这两个 OD 值在图 26-13 上连成一直线, 直线与各纵线交叉处, 即可查出标记抗体的以下数值: FITC $\mu\text{g/ml}$ 、F/P 的 $\mu\text{g/mg}$ 、F/P 的摩尔比值、蛋白 mg/ml 等。

四、荧光抗体的保存

以 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存, 防止抗体活性降低和蛋白变性。最好加入浓度为 1: (5 000~10 000) 的硫柳汞或 1: (1 000~5 000) 的叠氮钠防腐, 小量分装如 0.1~1 ml, 真空干燥后更易长期保存。

第四节 免疫荧光细胞化学染色方法

一、标本制作

可制作涂片、印片、细胞单层培养物、组织切片, 经适当固定或不固定, 作免疫荧光染色用。

二、荧光抗体染色方法

1. 直接法

(1) 染色切片经固定后, 滴加经稀释至染色效价如 1:8 或 1:16 的荧光抗体 (如兔抗人 γ -球蛋白荧光抗体或兔抗人 IgG 或 IgA 荧光抗体等), 在室温或 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 染色 30 min, 切片置入能保持潮湿的染色盒内, 防止干燥。

(2) 洗片 倾去存留的荧光抗体, 将切片浸入 pH 7.4 或 pH 7.2 PBS 中洗两次, 搅拌, 每次 5 min, 再用蒸馏水洗 1 min, 除去盐结晶。

(3) 用 50% 缓冲 (0.5mol/L 碳酸盐缓冲液 pH 9.0~9.5) 甘油封固、镜检。

(4) 对照染色 正常免疫荧光血清染色, 用上述法处理切片, 结果应为阴性。染色抑制试验 (一步法): 将荧光抗体和未标记的抗体球蛋白或血清 (相同) 等量混合, 用上述法处理切片, 结果应为阴性。为证明此种染色抑制不是由于荧光抗体被稀释所致, 可用盐水代替未标记抗血清, 染色结果应为阳性。此法结果较二步法稳定。类属抗原染色试验, 前面已作叙述。

直接法比较简单, 适合做细菌、螺旋体、原虫、真菌及浓度较高的蛋白质抗原如肾、皮肤的检查和研究。此法每种荧光抗体只能检查一种相应的抗原, 特异性高而敏感性较低。

2. 间接法

(1) 步骤 ① 切片固定后用毛细滴管吸取经适当稀释的免疫血清滴加在其上, 置于染色盒中保持一定的湿度, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min。然后用 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 洗两次, 10 min, 用吸水纸吸去或吹干残留的液体; ② 再滴加间接荧光抗体 (如兔抗人 γ -球蛋白荧光抗体等), 同上步骤, 染色 30 min, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 缓冲盐水洗两次 10 min, 搅拌, 缓冲甘油封固, 镜检。

(2) 对照染色 抗体对照: ① 用正常兔血清或人血清代替免疫血清, 再用上法进行染色, 结果应为

阴性；②抗原对照：即类属抗原染色，亦应为阴性；③阳性对照。

间接法中上述方法称双层法 (double layer method)。另一种称夹心法，即用未标记的特异性抗原加在切片上先与组织中之相应抗体结合，再用该抗原之荧光抗体重叠结合其上，而间接地显示出组织和细胞中抗体的存在。方法步骤如下：切片或涂片固定后，置于染色湿盒内；滴加未标记的特异性抗原作用切片于 37℃，30 min；缓冲盐水洗 2 次，每次 5 min，吹干；滴加特异性荧光抗体作用切片于 37℃，30 min；水洗，缓冲甘油封固，镜检。

间接法只需制备一种荧光抗体可以检出多种抗原，敏感性较高，操作方法较易掌握，而且能解决一些不易制备动物免疫血清的病原体（如麻疹）等的研究和检查，所以已被广泛应用于自身抗体和感染病人血清的试验。

3. 补体法

(1) 材料 ①免疫血清 60℃灭活 20 min，用 Kolmers 盐水作 2 倍稀释成 1:2，1:4，1:8……。补体用 1:10 稀释的新鲜豚鼠血清，抗补体荧光抗体等，按下述的补体法染色。免疫血清补体结合的效价，如为 1:32 则免疫血清应作 1:8 稀释；②补体用新鲜豚鼠血清一般作 1:10 稀释或按补体结合反应试管法所测定的结果，按 2 单位的比例，用 Kolmers 盐水稀释备用。Kolmers 盐水配法：即在 pH 7.4 0.1mol/L 的磷酸缓冲盐水中溶解 $MgSO_4$ ，含量为 0.01%；③抗补体荧光抗体：在免疫血清效价为 1:4，补体为 2 单位的条件下，用补体染色法测定免疫豚鼠球蛋白荧光抗体的染色效价，然后按染色效价 1:4 的浓度用 Kolmers 盐水稀释备用。

(2) 方法步骤 ①涂片或切片固定；②吸取经适当稀释之免疫血清及补体之等量混合液（此时免疫血清及补体又都稀释一倍）滴于切片上，37℃作用 30 min，置于保持一定湿度的染色盒内；③用缓冲盐水洗 2 次，搅拌，每次 5 min，吸干标本周围水液；④滴加经过适当稀释之抗补体荧光抗体 30 min，37℃，水洗同③；⑤蒸馏水洗 1 min，缓冲甘油封固。

(3) 对照染色 ①抗原对照；②抗血清对照：用正常兔血清代替免疫血清；③灭活补体对照：将补体经 56℃ 30 min 处理后，按补体同样比例稀释，与免疫血清等量混合后，进行补体法染色。

本法之荧光抗体不受免疫血清的动物种属的限制，因而一种荧光抗体可作更广泛的应用，敏感性亦较间接法高，效价低的免疫血清亦可应用，节省免疫血清，尤其是在检查形态小的立克次氏体、病毒颗粒等或浓度较低的抗原物质时甚为理想。

4. 膜抗原荧光抗体染色法 本法应用直接法或间接法的原理和步骤，可对活细胞在试管内进行染色，常用于 T 和 B 细胞、细胞培养物、瘤细胞抗原和受体等的检查和研究，阳性荧光主要在细胞膜上。FACS 即采用此法原理。

5. 双重染色法 在同一标本上有两个抗原需要同时显示（如 A 抗原和 B 抗原），A 抗原的抗体用 FITC 标记，B 抗原的抗体用罗丹明标记，可采用以下染色方法：

(1) 一步法双染色 先将两种标记抗体按适当比例混合 (A+B)，按直接法进行染色。

(2) 二步法双染色 先用 RB200 标记的 B 抗体染色，不必洗去，再用 FITC 标记的 A 抗体染色，按间接法进行。

结果：A 抗原阳性荧光呈现绿色，B 抗原阳性呈现橘红色荧光。

6. 荧光抗体再染色法 若切片或其他标本经某种荧光抗体染色后未获得阳性结果，而又疑有另外的病原体存在时，可用相应的荧光抗体再染色。

有时存档蜡块不能再用以切片，也可用存档的 HE 染色标本，褪去盖玻片和颜色，再作免疫荧光或其他免疫细胞化学的染色。

三、荧光抗原染色法

某些抗原可以用荧光素标记，制成荧光抗原，标记荧光素的方法与制备荧光抗体方法相同。用荧光

抗原可以直接检查细胞或组织内的相应抗体, 特异性较好, 敏感性较差。染色方法同荧光抗体染色的直接法。由于多数抗原难以提纯或量少昂贵, 一般很少采用此法。

第五节 荧光显微镜检查法

一、荧光显微镜

荧光显微镜是免疫荧光细胞化学的基本工具, 它由光源、滤板系统和光学系统等主要部件组成。它是利用一定波长的光激发标本发射荧光, 通过物镜和目镜系统放大以观察标本的荧光图像 (图 26-14)。

1. 光源 现在多采用 200 W 的超高压汞灯作光源, 它是用石英玻璃制作, 中间呈球形, 内充一定数量的汞, 工作时由两个电极间放电, 引起水银蒸发, 球内气压迅速升高, 当水银完全蒸发时, 可达 50~70 个标准大气压力, 这一过程一般约需 5~15 min。超高压汞灯的发光是电极间放电使水银分子不断解离和还原过程中发射光量子的结果。它发射很强的紫外和蓝紫光, 足以激发各类荧光物质, 因此, 为荧光显微镜普遍采用。

超高压汞灯也散发大量热能。因此, 灯室必须有良好的散热条件, 工作环境温度不宜太高。新型超高压汞灯在使用初期不需高电压即可引燃, 使用一些时间后, 则需要高压启动 (约为 15 000 V)。启动后, 维持工作电压一般为 50~60 V, 工作电流约 4 A 左右。200 W 超高压汞灯的平均寿命, 在每次使用 2 h 的情况下约为 200 h, 开动一次工作时间愈短, 则寿命愈短, 如开一次只工作 20 min, 则寿命降低 50%, 因此, 使用时尽量减少启动次数。灯泡在使用过程中, 其光效是逐渐降低的。灯熄灭后要等待冷却才能重新启动。点燃灯泡后不可立即关闭, 以免水银蒸发不完全而损坏电极, 一般需要等 15 min。由于超高压汞灯压力很高, 紫外线强烈, 因此灯泡必须置灯室中方可点燃, 以免伤害眼睛和发生爆炸时造成危险。

超高压汞灯 (100 W 或 200 W) 光源的电路和包括变压、镇流、启动几个部分。在灯室上有调节灯泡发光中心的系统, 灯泡球部后面安装有镀铝的凹面反射镜, 前面安装有集光透镜。国产超高压汞灯 GCQ-200 型性能良好, 可以代替 HBO-200 等型的进口灯泡, 平均寿命在 200 h 以上, 价格也比较低。我国研制的一种简易轻便型高色温溴钨荧光光源装置, 体积小、重量轻、功率小, 交、直流两用 (自带直流电源), 易于携带, 使用方便, 已推广应用。

2. 滤色系统 滤色系统是荧光显微镜的重要部位, 由激发滤板和压制滤板组成。各厂家滤板型号名称常不统一。滤板一般都以基本色调命名, 前面字母代表色调, 后面字母代表玻璃, 数字代表型号特点。如德国产品 (Schott) BG12, 就是种蓝色玻璃, B 是蓝色的第一个字母, G 是玻璃的第一个字母; 我国产品的名称已统一用拼音字母表示, 如相当于 BG12 的蓝色滤板名为 QB24, Q 是青色 (蓝色) 拼音的第一个字母, B 是玻璃拼音的第一个字母。不过有的滤板也可以透光分界滤长命名, 如 K530, 就是表示压制滤长 530 nm 以下的光而透过 530 nm 以上的光。还有的厂家的滤板完全以数字命名, 如美国 Corning 厂的 NO: 5-58, 即相当于 BG12。

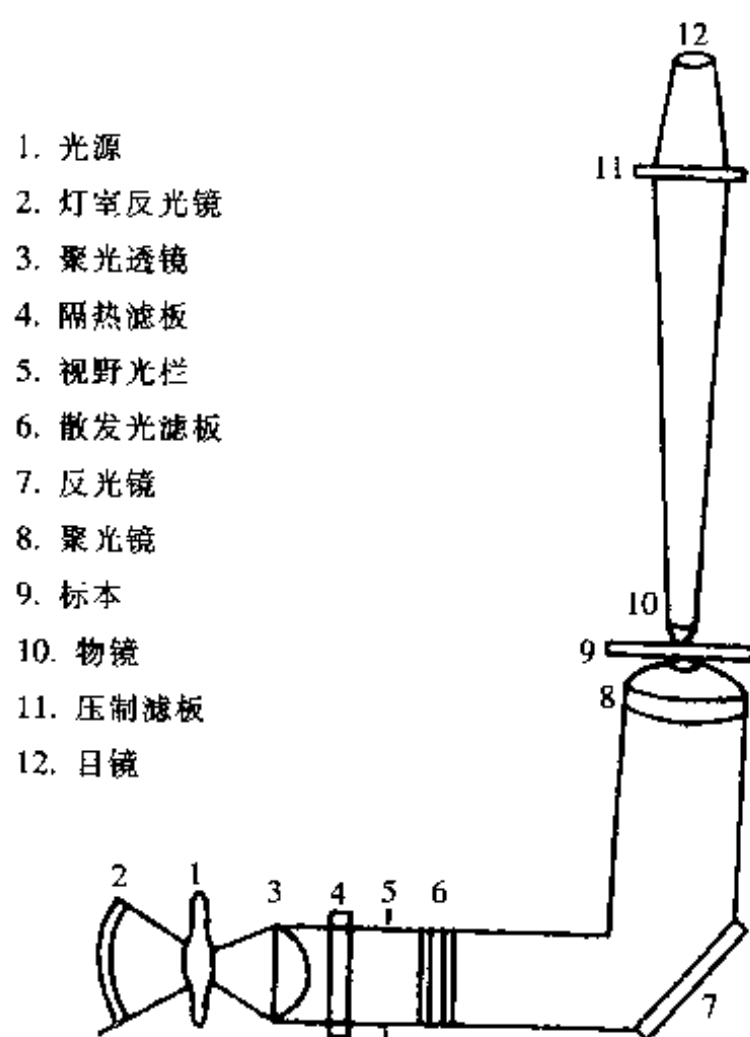


图 26-14 荧光显微镜的结构和主要部件

用于荧光显微镜的主要滤板如表 26-1。

表 26-1 荧光显微镜常用滤板型号和透光特点

基本色调	相应名称				2mm 厚透光范围 (峰值) nm
	上海电器元件厂	德国 (Schott)	俄国	日本	
黑紫	ZWB-1	UG-1	yΦC-2	DV-1	300~400 (365)
黑紫	ZWB-2	UG-5	yΦC-1		280~240 (360)
靛蓝	ZB-2	BG-1	ΦC-1	BG-1	300~500 (380)
靛蓝	ZB-3	BG-3	CC-4	BG-3	260~520 (400)
靛蓝	QB-24	BG-12	CC-8	BG-12	310~570 (420)
淡蓝	QB-10	BG-38	C3C-5		310~720 (460)
	QB-12		C3C-8		
			C3C-11		
橙黄	CB-3	OG-1 (K530)	OC-11	OG-1	530 以上
橙黄	JB-8	OG-4 (K510)	ЖC-18	FY-5	510 以上
绿橙	JB-7	GG-11 (K490)	ЖC-17	FY-3	480 以上
				FY-4	
淡绿	JB-4	GG-3 (K430)	ЖC-11	US-10	420 以上

(1) 激发滤板 根据光源和荧光色素的特点, 可选用以下三类激发滤板, 提供一定波长范围的激发光。

①紫外光激发滤板: 此滤板可使 400 nm 以下的紫外光透过, 阻挡 400 nm 以上的可见光通过。常用型号为 UG-1 或 UG-5, 外加一块 BG-38, 以除去红色尾波。

②紫外蓝光激发滤板: 此滤板可使 300~450 nm 范围内的光通过。常用型号为 ZB-2 或 ZB-3, 外加 BG-38。

③紫蓝光激发滤板: 它可使 350~490 nm 的光通过。常用型号为 QB24 (BG12)。

④蓝绿滤板: 最大吸收峰在 500 nm 以上者的荧光素 (如罗丹明色素) 可用蓝绿滤板 (如 B-7) 激发。

⑤近年开始采用金属膜干涉滤板, 由于针对性强、波长适当, 因而激发效果比玻璃滤板更好。如德国 Leitz 厂的 FITC 专用 KP490 滤板和罗丹明的 S546 绿色滤板, 均远比玻璃滤板效果好。

激发滤板分薄厚两种, 一般暗视野选用薄滤板, 亮视野荧光显微镜可选用厚一些, 基本要求是以获得最明亮的荧光和最好的背景为准。

(2) 压制滤板 压制滤板的作用是完全阻挡激发光通过, 提供相应波长范围的荧光。与激发滤板相对应, 常用以下 3 种压制滤板:

①紫外光压制滤板: 可通过可见光, 阻挡紫外光通过, 能与 UG-1 或 UG-5 组合。常用 GG-3K430 或 GG-6 K460。

②紫蓝光压制滤板: 能通过 510 nm 以上滤长的荧光 (绿到红), 能与 BG-12 组合。通常用 OG-4 K510 或 OG-1 K530。

③紫外紫光压制滤板: 能通过 460 nm 以上波长的荧光 (蓝到红), 可与 BG-3 组合, 常用 OG-11 K470AK 490, K510。

3. 反光镜 反光镜的反光层一般是镀铝的, 因为铝对紫外光和可见光的蓝紫区吸收少, 反射达 90% 以上, 而银的反射只有 70%, 一般使用平面反光镜。

4. 聚光镜 专为荧光显微镜设计制作的聚光器是用石英玻璃或其他透紫外光的玻璃制成。分明视野聚光器和暗视野聚光器两种, 还有相差荧光聚光器。

(1) 明视野聚光器 在一般荧光显微镜上多用明视野聚光器, 它具有聚光力强、使用方便等特点, 特别适于低、中倍放大的标本观察。

(2) 暗视野聚光器 暗视野聚光器在荧光显微镜中的应用日益广泛。因为激发光不直接进入物镜, 可以使用薄的激发滤板, 增强激发光的强度。压制滤板也可以很薄, 因紫外光激发时, 可用无色滤板(不透过紫外)而仍然产生黑暗的背景, 从而增强了荧光图像的亮度和反衬度, 提高了图像的质量, 观察舒适, 可能发现亮视野难以分辨的细微荧光颗粒。

(3) 相差荧光聚光器 相差聚光器与相差物镜配合使用, 可同时进行相差和荧光联合观察, 既能看到荧光图像, 又能看到相差图像, 有助于荧光的准确定位。一般荧光观察很少需要这种聚光器。

5. 物镜 各种物镜均可应用, 但最好用消色差的物镜, 因其自体荧光极微且透光性能(波长范围)适合于荧光。由于图像在显微镜视野中的荧光亮度与物镜镜口率的平方成正比, 而与其放大倍数成反比, 所以为了提高荧光图像的亮度, 应使用镜口率大的物镜。尤其在高倍放大时其影响非常明显。因此对荧光不够强的标本, 应使用镜口率大的物镜, 配合以尽可能低的目镜(4×、5×、6.3×等)。

6. 目镜 在荧光显微镜中多用低倍目镜, 如5×和6.3×。过去多用单筒目镜, 因为其亮度比双筒目镜高一倍以上, 但目前研究型荧光显微镜多用双筒目镜, 观察很方便。

7. 落射光装置 新型的落射光装置是从光源来的光射到干涉分光滤镜后, 波长短的部分(紫外和紫蓝)由于滤镜上镀膜的性质而反射, 当滤镜对向光源呈45°倾斜时, 则垂直射向物镜, 经物镜射向标本, 使标本受到激发, 这时物镜直接起聚光器的作用。同时, 波长长的部分(绿、黄、红等)对滤镜是可透的, 因此, 不向物镜方向反射, 滤镜起了激发滤板作用, 由于标本的荧光处在可见光长波区, 可透过滤镜而到达目镜观察, 荧光图像的亮度随着放大倍数增大而提高, 在高放大时比透射光源强。它除具有透射式光源的功能外, 更适用于不透明及半透明标本, 如厚片、滤膜、菌落、组织培养标本等的直接观察。近年研制的新型荧光显微镜多采用落射光装置, 称之为落射荧光显微镜。

二、荧光显微镜标本制作要求

1. 载玻片 载玻片厚度应在0.8~1.2 mm之间, 太厚的玻片一方面光吸收多, 另一方面不能使激发光在标本上聚集。载玻片必须光洁, 厚度均匀, 无明显自发荧光。有时需用石英玻璃载玻片。

2. 盖玻片 盖玻片厚度在0.17 mm左右, 光洁。为了加强激发光, 也可用干涉盖玻片, 这是一种特制的表面镀有若干层对不同波长的光起不同干涉作用的物质(如氟化镁)的盖玻片, 它可以使荧光顺利通过, 而反射激发光, 这种反射的激发光可激发标本。

3. 标本 组织切片或其他标本不能太厚, 如太厚激发光大部分消耗在标本下部, 而物镜直接观察到的上部不能充分激发。另外, 细胞重叠或杂质掩盖, 影响判断。

4. 封片剂 封片剂常用甘油, 必须无自发荧光, 无色透明, 荧光的亮度在pH为8.5~9.5时较亮, 不易很快褪去。所以, 常用甘油和0.5 mol/L pH为9.0~9.5的碳酸盐缓冲液的等量混合液作封片剂。

5. 镜油 一般暗视野荧光显微镜和用油镜观察标本时, 必须使用镜油, 最好使用特制的无荧光镜油, 也可用上述甘油代替, 液状石蜡也可用, 只是折光率较低, 对图像质量略有影响。

三、使用荧光显微镜的注意事项

1. 严格按照荧光显微镜出厂说明书要求进行操作, 不要随意改变程序。

2. 应在暗室中进行检查。进入暗室后, 接上电源, 点燃超高压汞灯5~15 min, 待光源发出强光稳定后, 眼睛完全适应暗室, 再开始观察标本。

3. 防止紫外线对眼睛的损害, 在调整光源时应戴上防护眼镜。

4. 检查时间每次以1~2h为宜, 超过90 min后超高压汞灯发光强度逐渐下降, 荧光减弱; 标本受紫外线照射3~5 min后, 荧光也明显减弱; 所以, 最多不得超过2~3h。

5. 荧光显微镜光源寿命有限, 标本应集中检查, 以节省时间, 保护光源。天热时, 应加电扇散热降温, 新换灯泡应从开始就记录使用时间。灯熄灭后欲再使用时, 须待灯泡充分冷却后才能点燃。一天中应

避免数次点燃光源。

6. 标本染色后立即观察,因时间久了荧光会逐渐减弱。若将标本放在聚乙烯塑料袋中 4℃保存,可延缓荧光减弱时间,防止封片剂蒸发。

7. 荧光亮度的判断标准:一般分为四级,即“-”——无或可见微弱荧光。“+”——仅能见明确可见的荧光。“++”——可见有明亮的荧光。“+++”——可见耀眼的荧光。

四、荧光图像的记录方法

荧光显微镜所看到的荧光图像,一是具有形态学特征,二是具有荧光的颜色和亮度,在判断结果时,必须将二者结合起来综合判断。结果记录根据主观指标,即凭工作者目力观察。作为一般定性观察,基本上是可靠的。随着科学技术的发展,在不同程度上采用客观指标记录判断结果,如用细胞分光光度计,图像分析仪等仪器。但这些仪器记录的结果,也必须结合主观的判断。

荧光显微镜摄影技术对于记录荧光图像十分必要,由于荧光很易褪色减弱,要即时摄影记录结果。方法与普通显微摄影技术基本相同。只是需要采用高速感光胶片如 ASA200 以上或 24°以上。因紫外光对荧光淬灭作用大,如 FITC 的标记物,在紫外光下照射 30 s,荧光亮度降低 50%。所以,曝光速度太慢,就不能将荧光图像拍摄下来。一般研究型荧光显微镜都有半自动或全自动显微摄影系统装置。

第六节 非特异性染色的消除方法

一、非特异性染色的主要因素

组织的非特异性染色的机制很复杂,其产生的原因主要可分为以下几点:

- (1) 一部分荧光素未与蛋白质结合,形成了聚合物和衍化物,而不能被透析除去。
- (2) 抗体以外的血清蛋白与荧光素结合形成荧光素蛋白,可与组织成分结合。
- (3) 除去检查的抗原以外,组织中还可能存在类属抗原(如 Forssman 氏抗原),可与组织中特异性抗原以外的相应抗体结合。
- (4) 从组织中难于提纯抗原性物质,所以制备的免疫血清中往往混杂一些抗其他组织成分的抗体,以致容易混淆。
- (5) 抗体分子上标记的荧光素分子太多,这种过量标记的抗体分子带过多的阴离子,可吸附于正常组织上而呈现非特异性染色。
- (6) 荧光素不纯,标本固定不当等。

二、消除非特异性染色的方法

消除荧光抗体非特异性染色的方法应根据产生的原因采取适当的方法,常用的方法有以下几种:

1. 动物脏器粉末吸收法 常用肝粉(猪、大白鼠或小白鼠),其次是骨髓粉、鼠脑粉和鸡胚粉等。每毫升荧光抗体中加入肝粉 50~100 mg,在离心管中充分混匀,在室温中振动 2 h,4℃中过夜,再搅拌 10 min,高速离心(3 000~15 000 rpm) 30 min,1~2 次后,即可使用其上清液。吸收一般应在临用前进行,吸收后之荧光抗体保存在冰箱中勿超过 2 周。染色应作吸收前后之比较,吸收时可先用缓冲盐水将组织干粉浸湿,离心(3 000~15 000 rpm) 30 min,除去上清液,再加入荧光抗体进行吸收,以免消耗过多的抗体。

肝粉或新鲜细胞吸收是一种非特异性的消除方法,对荧光抗体的荧光色素和蛋白都有吸附作用。如检查组织中的病毒抗原时,也可用相同的组织干粉或匀浆沉淀物吸收之。

用脏器肝粉吸收对荧光抗体损失较多,如果根据 Hiramotos 氏等的方法将组织的 20%生理盐水匀浆液,用生理盐水洗 2~3 次,12 000 rpm 10 min 离心沉淀,用其沉淀物吸收其荧光抗体即能完全达到目

的, 京极方久氏认为这样吸收对荧光抗体几乎没有损失, 他们常用此法, 效果甚佳, 吸收后放置一周左右, 用时有必要再吸收一次。

【肝粉的制法】

(1) 将若干只小白鼠或大白鼠放血杀死, 取出肝脏, 用生理盐水洗 2~3 次, 除去血液, 剥掉表面的结缔组织的脂肪。

(2) 剪碎, 用生理盐水反复洗涤至无血色为止, 然后再加生理盐水少许, 用组织捣碎机或匀浆器作成匀浆。

(3) 将肝匀浆装入离心管内 (1/3 左右), 交换地用 2~3 倍量生理盐水和丙酮反复洗涤各三次, 至上清无血色为止, 每次完毕先用 2000rpm 离心沉淀 15 min 后, 再除去上清液。

(4) 最后用丙酮洗涤肝浆, 再用布氏漏斗过滤或离心沉淀, 将沉淀物平铺在洁净的玻璃板上, 37℃ 烤干 (过夜)。

(5) 在研钵中充分研磨, 用 120 目铜筛筛选过后, 分装, 密封, 低温干燥保存。

2. 透析法 荧光素如 FITC 分子可以通过半透膜, 而蛋白质大分子不能透过, 可将未与蛋白结合的荧光素透析除去。步骤如下:

(1) 将标记完毕的荧光蛋白液装入一透析袋或玻璃纸袋内, 液面稍留空隙, 扎紧。

(2) 浸入 0.02 mol/L pH 7.1~7.4 的 PBS 中 (悬浮于大于标记物体积约 50~100 倍的 PBS 内), 在 4℃ 中透析, 每日更换 3~4 次 PBS, 约 5~7d, 透析液中无荧光素即可 (在荧光光源照射下)。

3. 葡聚糖凝胶 G-50 柱层析法 去除游离荧光素可用 2cm×46cm 柱层析法。加入荧光抗体 15~18 ml (按床体积的 5%~10% 加样), 使其缓慢渗入柱内, 待即将全部入柱时, 加入 PBS 少许, 关闭下口, 停留 30~40 min, 使游离荧光充分进入细筛孔中, 然后再接通洗脱瓶开始滴入洗脱液。加入洗脱液一定量后, 荧光抗体即向下移行, 逐渐与存留于上端的游离荧光素之间拉开明显的界线, 随着大量洗脱液的不断加入, 二者分离距离越来越大, 荧光抗体最先流出, 分前、中、后三部分收集, 测 F/P 比值, 合格者合并, 浓缩, 分装。洗脱液用 20% 磺基水杨酸测定蛋白 (发生沉淀反应), 继续洗脱, 游离荧光素则相继被洗脱下来, 至洗脱液中无蛋白和荧光素后, 此层析柱即可再用。

若用以除去荧光抗体中的游离荧光素和硫酸铵等盐类, 可先在过柱前透析一夜, 否则, NH_4^+ 太浓, 在蛋白未完全洗脱时即出现 NH_4^+ , 因而影响提纯与回收蛋白, 一般待洗脱液出现蛋白时, 即进行收集, 之后出现 SO_4^{2-} 用 (1% BaCl_2 检查发生白色沉淀)。最后是 NH_4^+ , (用纳氏试剂检查呈黄棕色沉淀), 待洗脱液无 SO_4^{2-} 及 NH_4^+ 后可再用。

如仅用小量荧光抗体, 可用 1cm×20 cm 的柱层析柱, 取 2g Sephadex G-50 装柱, 即可过滤 2~3.5 ml 荧光抗体。

4. DEAE 纤维素柱层析法 标记过多或过少荧光素的抗体分子可用 DEAE-纤维素柱层析法除去。方法如下: DEAE-纤维素柱的装柱, 洗脱、再生方法等与提纯 IgG 方法相同; 装柱所需 DEAE-纤维素量以干重每克交换 20~50 mg 标记蛋白量为宜。常用梯度洗脱法如下:

(1) 层析柱用 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 平衡, 标记物上柱后, 先用 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 洗脱, 洗出无色或淡绿色液体, 洗脱液量根据床体积大小每梯度乘 3, 然后依下列各种离子强度洗脱液分别洗脱和收集: 0.01 mol/L pH 7.2 PBS (0.05 mol/L NaCl) 这部分为脱部分 1; 0.01 mol/L pH 7.2 PBS (0.01 mol/L NaCl) 这部分为脱部分 2; 0.01 mol/L pH 7.2 PBS (0.02 mol/L NaCl) 这部分为脱部分 3。分别测定此三部分收集液 (每管 5 ml) F/P 比值, 0.05 mol/L NaCl pH 7.2 PBS 洗脱液 280 nm 光密度高峰管合并, 浓缩保存备用。因这部分非特异性染色荧光最少, 是比较好的荧光抗体。其他两部分可以废弃。

(2) 柱上吸附的过度标记蛋白可继续增加 NaCl 的浓度至 2.0 mol/L 洗脱完。经过 DEAE-纤维素层析后的标记抗体, 其抗体量一般约损失 50%, 因此有些要求不太高的抗体, 如抗细菌荧光抗体, 不一定要这样处理, 可用染色效价测定的稀释法除去非特异性染色。

5. 荧光抗体稀释法 先测定荧光抗体特异性染色与非特异性染色的效价,若二者效价相差较大,则可将荧光抗体稀释至一临界浓度,使特异性染色呈阳性,而使非特异性染色保持阴性,稀释方法和染色效价测定方法相同。

6. 纯化抗原法 用各种方法提纯单一成分的抗原是产生单价特异性抗体的最主要条件。近代免疫化学技术(免疫吸收法)和柱层析法等提供了很大的可能性,可参考有关专著。

7. 纯化抗体法——免疫吸收法 例如抗 IgA 血清的纯化方法——免疫吸收法。如分泌型 IgA (sIgA) 抗原纯度不高,所制的抗血清常与 IgG 呈交叉反应,为此需要吸收纯化,常采用纯化的人 IgG 戊二醛聚合物加以吸收纯化。方法如下:

(1) 人 IgG 聚合物的制备 在 5 ml 含 40 mg/ml 人 IgG 的 0.1 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲溶液中,加入 2.5% 戊二醛溶液 1 ml,边加边搅,5 min 即出现混浊,逐现大块胶块,放置 30 min 后,用研钵将凝胶磨细,继用 1.0 mol/L pH 7.0 磷酸缓冲溶液反复洗涤 3 次,末次加蒸馏水至 20 ml,即为 IgG 聚合物悬液。

(2) 免疫吸收法 将待吸收的抗 sIgG 血清加入等量 IgG 聚合物悬液,置室温搅拌 60 min,离心沉淀,上清液即稀释 1 倍的纯化抗 sIgA 血清。如用 IgG 聚合物作少量分次吸收,其效果更好。

8. 伊文氏蓝 (Evans blue) 衬染法 用 0.01% 伊文氏蓝的 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 稀释荧光抗体,可将背景细胞和组织染色,呈红色荧光,与特异性黄绿色荧光形成鲜明的对比,减少了非特异性荧光,在进行激光扫描共聚焦显微镜观察时,最好不用。在目标荧光进行叠加时有一定影响。伊文氏蓝一般先配成 1% 溶液,保存于 4℃,用前再稀释至 0.01% 用以稀释荧光抗体。此外,还可以用胰酶消化组织切片或用 10% 牛血清蛋白封闭法等消除非特异性染色,提高特异性染色。

第二十七章 亲和组织化学技术

20 世纪 70 年代以来, 由于免疫组织化学方法的广泛应用, 在技术方法上不断得以改进, 涌现了一批新的技术方法, 其特点为一些具有双价或多价结合力的物质如植物凝集素 (lectin)、生物素 (biotin) 和葡萄球菌 A 蛋白 (staphylococcal protein A, SPA) 等被应用于免疫细胞化学技术, 从而建立了 SPA-HRP 法、ABC 法、BRAB 法和 LAB 法等。这些方法的共同特点是以一种物质对某种组织成分具有高度亲和力为基础。它们一方面区别于古老的组织化学的分解、置换、氧化和还原, 另一方面本质上是非抗原抗体反应。因此, Bayer (1976) 首次称之为亲和组织化学 (affinity histochemistry)。事实上, 抗原抗体反应从本质上也属于亲和组织化学这一范畴, 只是近代免疫组织化学方法的更新更突出了“亲和”这一组织化学技术特点。目前, 亲和组织化学包括抗原与抗体、植物凝集素和糖类、生物素与抗生物素、葡萄球菌 A 蛋白与 IgG、阳离子与阴离子、激素、维生素、糖及类脂质作用部位和受体等。亲和细胞化学引入免疫细胞化学后使其敏感性得到进一步提高, 因此更有利于微量抗原 (或抗体) 在细胞或亚细胞水平的定位。

第一节 抗生物素—生物素免疫细胞化学染色法

一、基本原理

很早以前, 人们就注意到给动物饲以大量的鸡蛋白, 会引起明显的“维生素 H 缺乏症”, 也称为“蛋白质伤害”。经研究发现, 在鸡蛋白中含有一种碱性蛋白, 分子量为 68 000, 属于糖蛋白, 当时命名为卵白素 (avidin)。卵白素具有 4 个同维生素 H (biotin, 又名生物素) 亲和力极高的结合点, 给动物饲以大量鸡蛋白所致的维生素 H 缺乏, 就是由于卵白素和大量的维生素 H 结合所致。维生素 H (以下统称生物素) 是一种小分子的维生素, 分子量为 244, 系转氨甲酰基化过程中的辅酶, 它与卵白素之间有很强的亲和力, 较之抗体对抗原的亲和力要高出 100 万倍, 能够彼此牢固结合而不影响彼此的生物学活性。同时, 生物素与卵白素都具有与其他示踪物质如荧光素、铁蛋白和过氧化酶等相结合的能力。免疫细胞化学工作者利用上述特性, 建立了卵白素-生物素免疫染色系统。由于维生素 H 习惯上称为生物素, 为便于理解, 现在译名上统称卵白素为抗生物素或亲和素。所以卵白素-生物素免疫染色系统又称为抗生物素—生物素免疫染色法。

二、几种抗生物素—生物素染色法

1. 抗生物素—生物素—过氧化酶复合物技术 (avidin biotin-peroxidase complex technique, 简称 ABC 技术)

(1) 基本原理 ABC 法是 Hsu 等于 1981 年在 HRAB 法和 LAB 法的基础上改良的, 其特点是利用抗生物素分别连接生物素标记的第二抗体和生物素标记的酶。与 LAB 法和 BRAB 法不同的是第一抗体不为标记物所标记, 生物素标记的第二抗体与 ABC 复合物相连接。复合物是将过氧化酶结合在生物素上, 再将生物素—过氧化酶连接物与过量的抗生物素蛋白反应而制备的 (图 27-1), 最后进行显色反应定位。

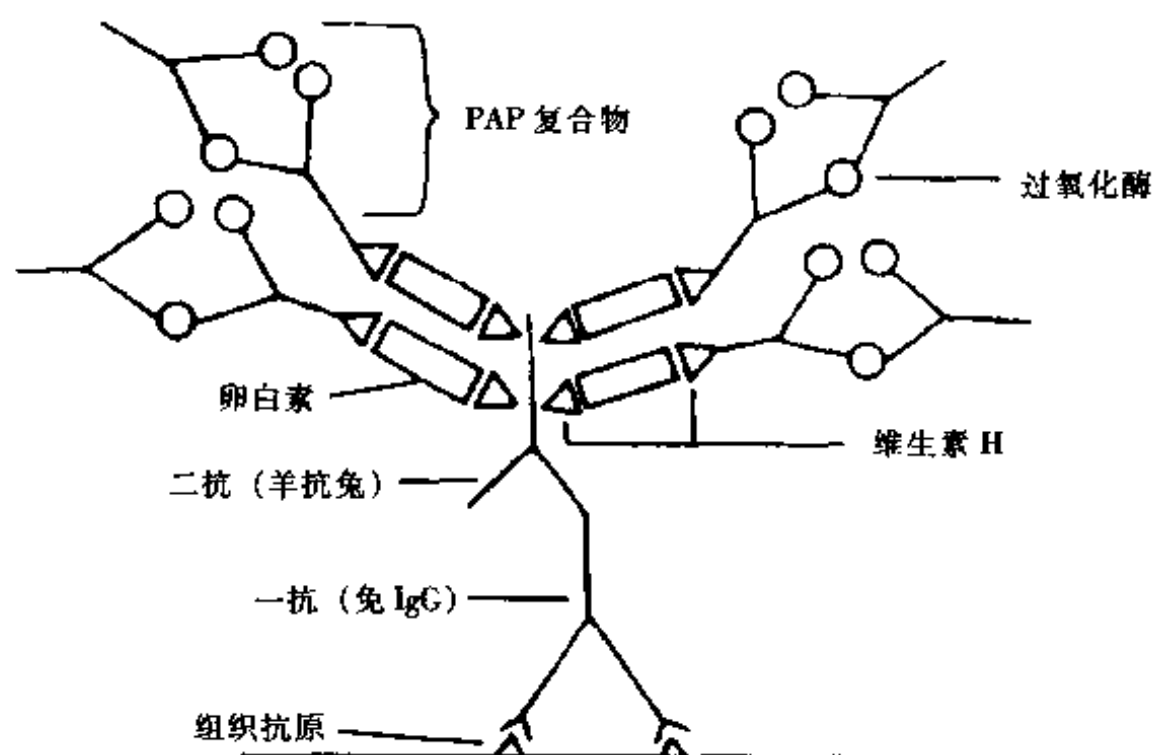


图 27-1 ABC 法

(2) 操作步骤

- ①冰冻切片或石蜡切片均可；
- ②冰冻切片可用丙酮固定 10 min 左右，0.01 mol/L PBS (pH 7.2~7.6) 洗 5 min，更换 3 次。石蜡切片需经脱蜡，梯度酒精至水；
- ③第一抗体，室温孵育 15 min；
- ④PBS 洗 5 min，更换 3 次；
- ⑤加生物素标记的第二抗体 (1:200 左右)，孵育 15 min；
- ⑥PBS 洗 5 min，更换 3 次；
- ⑦加 ABC 复合物室温作用 15 min；
- ⑧PBS 洗 5 min，更换 3 次；
- ⑨用 DAB-H₂O₂ 液（配法见附录二）显色；

⑩复染；

⑪封片、观察。

ABC 复合物的配制：经试验确定生物素与抗生物素之比为 1:4 时，能获得最佳满意效果。即抗生物素 10 μg/ml 加 2.5 μg/ml 生物素，应用 0.05 mol/L Tris-HCl 液，pH 7.6，在应用前 30 min 配制。

(3) ABC 法的评价及实验注意事项

敏感性高：Hsu 等应用 ABC 法与 PAP 法相比发现敏感性较 PAP 法高 20~40 倍，能显示 PAP 法所不能显示的抗原。这是因为生物素与抗生物素间有较强的结合力，一个抗生物素分子具有可与生物素结合的 4 个活性部位，其中一部分可与生物素标记的过氧化物酶相结合，另一部分可与生物素标记的免疫球蛋白结合。生物素通过氨基与抗体或过氧化物酶分子相结合，一个过氧化物酶或免疫球蛋白分子可以结合多个生物素分子，从而增加了免疫球蛋白或过氧化物酶结合抗生物素的能力。在 ABC 反应中，抗生物素作为桥连接于生物素标记的酶和生物素标记的抗体之间，而生物素标记的过氧化物酶分子又可作为桥连接于抗生物素分子之间，于是形成了一个含有 3 个以上过氧化物酶分子（大于 PAP 复合物）的网格状复合物，敏感性极大提高。

特异性高，背景染色淡：由于敏感性高，第一抗体和第二抗体都可被稀释至尽可能低的浓度，减少了非特异性染色。

方法简便，节约时间：由于 ABC 法敏感，操作的抗原抗体反应的时间可由 PAP 法所需的数天缩短为 2 h 左右，各层抗体作用仅需 15 min。国内上海生物制品所等单位制备的生物素-抗生物素染色药盒经质量鉴定符合标准，已提供国内市场。由于生物素与抗生物素具有和多种示踪物结合的能力，可用于双重或多重免疫染色。

实验注意事项：生物素是一种辅酶，是在脱羧基酶、羧基转换酶等催化的代谢环节中所产生的羧基的中间载体，它存在于某些组织和细胞内，在应用 ABC 染色时会与抗生物素结合而产生非特异性染色。因此，对抗生物素结合性较高的组织如肝、肾、白细胞、脂肪组织和乳腺，在应用 ABC 方法前应预先以 0.01% 的抗生物素和 0.01% 的生物素溶液分别作用 20 min 左右，以消除内源性抗生物素结合活性，每次作用后用 PBS 洗 5 min，更换 3 次。Naritoku 和 Taylor (1982) 报告神经组织中的乳糖可与抗生物素结合产生假阳性反应，以 2-甲基-O-甘露糖预孵育切片可封闭神经组织内乳糖分子上的结合点，从而阻止与

抗生物素蛋白的结合。必要时,也可用 0.3% H_2O_2 -100% 甲醇孵育以消除内源性过氧化物酶活性。

生物素制剂之间相互亲和性差异大,因此在应用 ABC 试剂时,应注意厂家和批号,对购进试剂应进行事先测试,以保证实验结果的稳定性。

ABC 试剂保存温度以 4℃ 为佳,据报告保存可达两年之久,仍能获得满意效果,而在 -20℃ 生物活性在短期内即被破坏。

2. 桥抗生物素-生物素技术 (Bridged Avidin-Biotin technique, 简称 BRAB 技术)

该技术方法是用生物素分别标记抗体和酶,然后以抗生物素为桥,把两者连接起来(图 27-2)。

检查抗原时,先用生物素标记的抗体与细胞(或组织内)的抗原反应,洗去未结合的抗体,加入抗生物素孵育后,洗去未结合的抗生物素,再加入已标记酶的生物素孵育,洗片,以细胞化

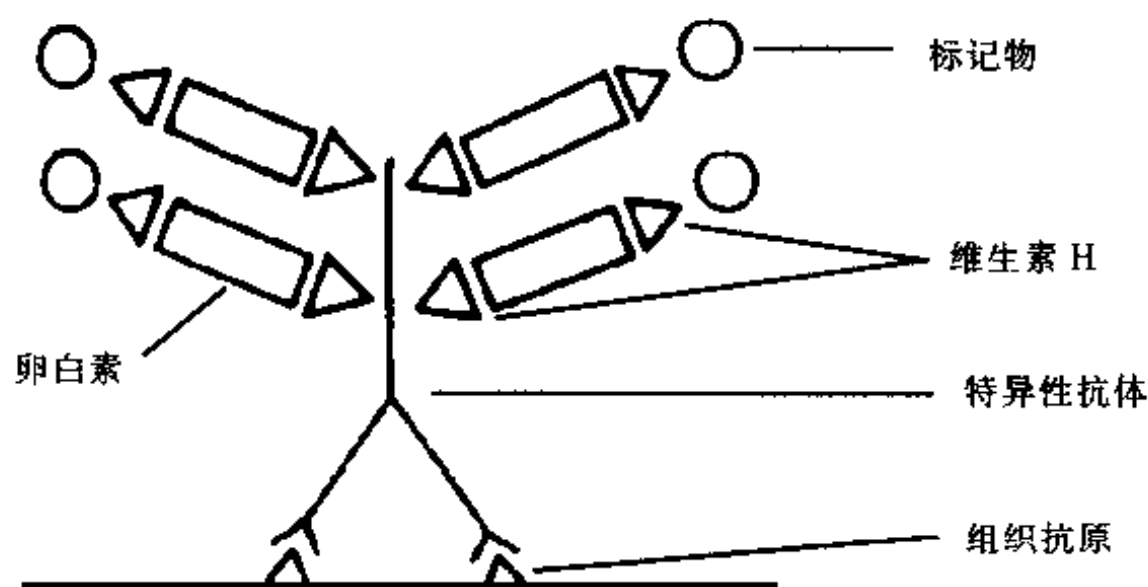


图 27-2 BRAB 技术

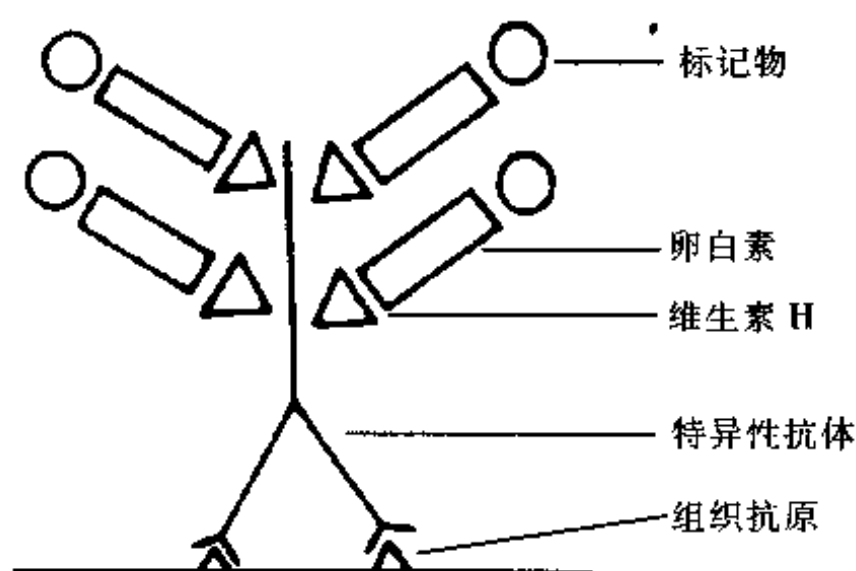


图 27-3 LAB 技术

学方法呈色反应。

3. 标记抗生物素-生物素技术 (Labelled Avidin-Biotin technique, LAB 技术) 以生物素标记抗体作第一抗体,酶标记抗生物素作为第二抗体(图 27-3)。操作步骤如下:

- (1) 切片在含有 25~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 生物素标记抗体 (PBS 液稀释) 中室温孵育 1 h;
- (2) PBS 洗 2 次,每次 5 min;
- (3) 用 20~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 过氧化物酶标记的抗生物素液孵育 90 min,水洗;
- (4) 酶呈色反应。

BRAB 法和 LAB 法是 Guesdon 及其同事于 1979 建立的,由于这两种方法都需以生物素标记第一抗体,应用不如 ABC 法普遍。但用于免疫细

胞中免疫球蛋白的显示具有特异性。二者比较,LAB 法较简便,但灵敏度较低。

抗生物素-生物素染色法采用免疫细胞化学染色中各种常用固定剂(见附录),均可获得较满意的结果。但有实验报告推荐“PLP”固定液(即过碘酸-赖氨酸-多聚甲醛固定液),其配制法亦见附录。PLP 固定后,依次经系列蔗糖磷酸缓冲液(10%, 15%, 20%各 5 min),进行冰冻切片,贴于载片上,置室温风干 30 min 或 37℃ 3~4 h 或过夜。染色前用 PBS 湿润水化切片,可获得满意染色效果。

第二节 葡萄球菌蛋白 A (SPA)

葡萄球菌蛋白 A (Staphylococcal Protein A, SPA) 是一种从金黄色葡萄球菌细胞壁分离的蛋白质。早在 1940 年, Vervwey 发现在某些金黄色葡萄球菌中含有一种物质,在双向扩散试验中能与正常人血清形成沉淀。Jensen (1959) 也发现类似现象,并将其命名为 A 抗原。直到 1963 年 Lofkvist 等分离了该抗

原, 并证明它是一种蛋白质。Grosv (1960) 将其命名为葡萄球菌蛋白 A, 简称 SPA 或蛋白 A (protein A)。由于 SPA 的一些免疫特性, 它已引起广大免疫学研究者的兴趣, 并发展成为免疫学上一种极为有用的工具。

一、SPA 的性质

1. SPA 存在于大多数 (90%) 金黄色葡萄球菌中, 而不存在于表皮葡萄球菌中。并且主要存在于血浆凝固酶阳性菌株, 而不存在于阴性菌株中。前者是致病的, 后者是非致病的, 但在体内研究中尚未发现 SPA 和菌株致病性之间有任何肯定的关系。不同菌株间的 SPA 含量有明显差异, 以 I 株金黄色葡萄球菌含 SPA 量最高, SPA 和细胞壁的肽聚糖呈共价结合。抗二甲氧基苯青霉素突变株 (methicillin-resistant strain) 能产生分泌性 SPA, 它较之细胞壁所含的 SPA 在免疫学性质上相似, 但易分离, 损失少。

2. SPA 为蛋白质成分, 仅含少量或不含碳水化合物, 其分子量因提取方法不同而异, 用脱氧核糖核酸酶消化细胞壁后超速离心或用加热抽提法, 所测分子量为 12 000~15 000。用沉淀平衡分析和在 6 mol/L 鸟嘌呤盐酸盐中凝胶过滤, 测出分子量为 42 000。SPA 为多肽单链, 内含 3 个高度相似的 Fc 段结合区, 每区由 50 个以上的氨基酸组成, 不含色氨酸和半胱氨酸。其羧基末端是赖氨酸, 氨基末端结构尚未肯定。SPA 粘度高于球蛋白, 等电点为 pH 5.1, 其天然结构十分稳定, 在应用 6 mol/L 鸟嘌呤盐酸盐变性剂的条件下, 尚能保存某些三级结构, 如将此变性剂除去, 则能自然矫正而恢复原有结构。

3. SPA 之所以引起免疫学研究者的重视, 是因为它具有的免疫学特性。SPA 具有和人与许多动物如豚鼠、猪、小鼠、猴等 IgG 结合的能力。SPA 结合部位是 Fc 段而不是 Fab 段, 这种结合不会影响抗体的活性。SPA 具有的结合力是双价的, 每个 SPA 分子可以同时结合两个 IgG 分子, 也可一方面同 IgG 相结合, 一方面与标记物如荧光素、过氧化物酶、胶体金和铁蛋白等相结合。还有一个有趣的事实是, 和 SPA 结合后的 IgG 可用 4 mol/L 鸟嘌呤盐酸盐等使之解离。SPA 对 IgG 免疫球蛋白亚型的结合有选择性, 如 SPA 与人 IgG 亚型: IgG₁、IgG₂、和 IgG₄ 有结合力, 唯独不结合 IgG₃。只结合 IgA₂, 而不结合 IgA₁。SPA 和禽类血清 IgG 不结合。

4. SPA 具有多种生物学作用, 如引起豚鼠解离体回肠的收缩, 在吞噬反应中抑制 IgG 调理素吞噬和杀菌作用, SPA-IgG 复合物能固定人的补体和人、狗、猪的新鲜补体, 对人类 B 细胞具有促有丝分裂因子的作用等。

二、SPA 的应用

自 70 年代开始, 国外应用 SPA 建立了许多敏感性高、特异性强、快速和简易的实验方法, 并在许多方面的应用中积累了实际应用的材料, 现已广泛应用到免疫学及其相关科学如细胞学、细菌学和病毒学等。其可能应用的范围可归纳为以下四个方面:

1. 应用于免疫球蛋白的制备和分析 SPA 是一种比较理想的提纯和分析免疫球蛋白的试剂。由于 SPA 与 IgG 及其某些亚型的 Fc 段有较强的结合力, 可利用来提纯、分析免疫球蛋白制剂, 结合后的 SPA-IgG 可再用解离剂如 4 mol/L 尿素、4 mol/L 硫氰酸盐或 6 mol/L 的鸟嘌呤盐酸盐使之解离, 多用 SPA-Sepharose 层析柱分离 IgG 或其亚型及断片如 Fc、Fab 等。

2. 应用于免疫细胞化学 由于 SPA 具有双价结合力, 在免疫细胞化学技术中可作为桥抗体或标记抗体。SPA 能与多种动物的 IgG 的 Fc 段结合, 因此, 作为第二抗体或标记抗体, SPA 的最大优点是不受种属特异性的限制, 故在目前各种免疫细胞化学技术中已得到广泛的应用。除不受种属限制这一特点外, SPA 法还具有染色时间短、灵敏性高和背景染色淡等优点。据报告用国产酶联 SPA 代替酶标记抗体, 应用间接染色, 时间较 PAP 法省时一半。SPA 分子量小 (13 000~42 000), 易于穿透组织, 而免疫球蛋白酶标记抗体为 200 000, PAP 复合物为 430 000, 均较 SPA 分子量大。

3. 应用于多种细菌、支原体和病毒等病原体的简易快速诊断 可应用 SPA 菌体作为载体, 结合特

异性抗体成为一种吸附原,作协同凝集剂,用于某些细菌和病毒的定群和分型。

4. 可作为一种研究免疫复合物、膜抗原、膜受体和膜 Ig 的固相吸附剂 Hallgsen 用放射性核素标记 SPA 测定血 IgG 的凝集物,发现 85% 全身性红斑狼疮和 42% 类风湿病人血清中凝集物增高。SPA 用于细胞膜抗原、表面 IgG 和 Fc 受体的研究最大特点是能研究活细菌。Ghetie (1976) 用 SPA 致敏绵羊红细胞,与经 IgG 处理的细胞形成玫瑰花环,来鉴定带 Fc 受体的细胞。反之,如用 SPA 抑制玫瑰花环形成,则可定量测定细胞表面的 IgG。应用 SPA 与胶体金或铁蛋白相结合,可在电镜水平检查抗原抗体反应的定位。特别是蛋白 A-胶体金技术 (protein A-gold technique, PGA 技术) 自 Pomano 和 Romano (1977) 首次报告用于标记细胞表面抗原、包括淋巴细胞、血小板、大鼠肾脏细胞及感染的病毒细胞获得成功以后,已得到愈来愈广泛的应用,是一种较为理想的免疫电镜技术。

三、SPA 在免疫细胞化学染色中的应用

SPA 可为多种示踪物如荧光素、酶、胶体金、铁蛋白等所标记,应用较广的为酶标记 SPA 和金标记 SPA 技术,可参考其他专著。标记 SPA 常用的酶为 HRP,可应用于间接法,SPA 在 PAP 法中可代替桥抗体。

1. SPA-HRP 用于间接法的操作步骤

- (1) 切片经脱蜡后用 0.5% H_2O_2 -纯甲醇液处理 5 min 以抑制内源性过氧化物酶活性;
- (2) 用 Tris 盐酸缓冲液 (0.05 mol/L pH7.6) 洗 2 次,每次 3 min;
- (3) 以第一抗体血清覆盖处理切片,37℃,孵育 30 min,或 4℃ 24~48 h;
- (4) 用 Tris-HCl 缓冲液洗 3 次,每次 5 min;
- (5) 加 SPA-HRP (1:100~1:400) 处理 30 min;
- (6) Tris-HCl 缓冲液洗 3 次,每次 5 min;
- (7) DAB- H_2O_2 显色;
- (8) 复染、脱水、透明、封固。反应物为棕色。

2. SPA 用于 PAP 法的操作步骤

- (1) 切片脱蜡至水洗;
- (2) 80% 甲醇 (含 0.6% H_2O_2) 封闭内源酶活性 5 min;
- (3) 10% 卵清蛋白 Tris 缓冲液, 20 min;
- (4) 第一抗体作用 37℃, 30 min 或 4℃, 16~48 h;
- (5) 0.05 mol/L pH 7.6 Tris-HCl 缓冲盐液洗片 5 min;
- (6) SPA (1 μ g/ml) 5 min;
- (7) Tris-HCl 盐液洗 5 min;
- (8) PAP 复合物 (无种属限制), 5 min;
- (9) Tris-HCl 盐液洗切片 5 min;
- (10) DAB (0.6 mg/ml), 加 0.01% H_2O_2 反应 5 min, 然后水洗;
- (11) 复染: 常用 Mayer 苏木精液数秒至 1 min (视需要而定), 水洗;
- (12) 脱水、透明、封固、镜检。

3. SPA-HRP 的制备 应用 Nakane 和 Kawaoi 1974 年建立的过碘酸法,酶:SPA=2:1,即 HRP 10 mg, SPA 5mg。

- (1) 10 mg 溶于新鲜配制的 pH 8.1 0.3 mol/L 碳酸氢钠溶液 1 ml, 加入 0.1 ml 1% 二硝基氟苯无水乙醇溶液以封闭酶分子中的氨基,使酶不发生自身聚合,室温轻轻搅拌 1 h;
- (2) 加入 1 ml 0.04~0.08 mol/L (依不同批号的酶而定) 的 $NaIO_4$, 室温搅拌 30 min;
- (3) 加入 1 ml 0.16 mol/L 乙二醇, 室温轻搅 1 h;

- (4) 用 1 000 ml 0.01 mol/L pH 9.5 碳酸盐缓冲液充分透析 (4℃, 过夜), 换缓冲液 3 次;
- (5) 加 5 mg SPA 至 0.1 mol/L pH 7.4 碳酸钠缓冲液 1 ml, 室温轻搅 2~3 h;
- (6) 加 5 mg 硼氢化钠 (NaBH_4) 终止氧化, 置 4℃ 冰箱 3 h 或过夜;
- (7) 对 PBS 透析 24 h, 4℃ 离心去沉淀, 半饱和硫酸铵洗沉淀结合物 3 次, 溶于 1 ml 0.02 mol/L pH 7.4 的 PBS 中;
- (8) 对 PBS 充分透析, 经测定后分装, 贮于 -20℃ 冰箱中保存备用;

用过碘酸钠法可以得到很高标记率的 HRP-SPA 标记物, 而且保存了抗体的全部活性, 敏感度高, 稳定性强, 大大优于戊二醛标记抗体法, 国内现在也有 HRP-SPA 的标记物供应, 但要注意由于各家所用的 SPA 可能来源于不同菌株, 在性质上可能存在一些差异。

4. 注意事项 在使用二硝基氟苯后, 会产生氟化氢, 应充分透析除净, 否则会抑制酶活性。标记时过碘酸浓度不宜过高, 氧化时间不宜过长, 否则会产生过度标记, 即多个酶分子结合到一个蛋白 A 分子上。这些过度标记蛋白 A 的免疫反应性很差, 容易产生非特异性染色。标记时加入酶与 SPA 的比例应适合, 比值过大易产生过度标记, 比值小则标记蛋白 A 产率低。过碘酸氧化结果能使酶具有多个醛基, 从而能与多个蛋白分子的氨基相结合, 成为一些大分子的聚合物。因此, 有研究者强调指出, 对要求具有较强的细胞穿透力的免疫细胞化学实验应考虑是否适用。但国内有实验室应用上海生物制品所产生的过碘酸氧化制备 HRP-SPA 用于免疫电镜研究, 仍获得了较为满意的结果。

第三节 凝集素

凝集素 (lectin) 是指一种从各种植物、无脊椎动物和高等动物中提纯的糖蛋白或结合糖的蛋白, 因其能凝集红细胞 (含血型物质), 故名凝集素。其常见种类见表 27-1。常用的为植物凝集素 (phytoagglutinin, PNA) 通常以其被提取的植物命名, 如刀豆素 A (concanavalin, conA)、麦胚素 (wheat germ agglutinin, WGA)、花生凝集素 (peanut agglutinin, PNA) 和大豆凝集素 (soybean agglutinin, SBA) 等, 凝集素是它们的总称。凝集素不是来源于或参与免疫反应的产物, 但凝集素具有某些“亲和”特性, 能被免疫细胞化学技术方法所应用。因此, Ponder (1983) 提出应称“凝集素组织化学”而不能称为“凝集素免疫组织化学”。

一、凝集素的特性

凝集素具有多方面的特性, 在此我们仅简要提及其与免疫细胞化学技术方法应用有关的某些特性。众所周知, 生物膜中含有一定量的糖类, 主要以糖蛋白和糖脂的形式存在。凝集素最大的特点在于它们能识别糖蛋白和糖肽中, 特别是细胞膜中复杂的碳水化合物结构, 即细胞膜表面的糖脂化合物决定簇。一种凝集素具有对某一种特异性糖基专一性结合的能力, 如刀豆素与 α -D-吡喃糖基甘露糖 (α -D-mannopyranosy) 结合; 麦芽素与 N-乙酰糖胺 (N-acetyl glucosamine) 结合; 菜豆凝集素与 N-乙酰乳糖胺结合 (表 27-1)。因此, 凝集素可以作为一种探针来研究细胞膜上特定的糖基。另一方面, 凝集素具有多价结合能力, 能与荧光素、生物素、酶、胶体金和铁蛋白等示踪物结合, 从而在光镜或电镜水平显示其结合部位。

二、凝集素的应用

一般认为细胞膜上特定的糖基可用以区别细胞的类型和反映细胞在分化、成熟和肿瘤细胞性变中的变化。仅在某些特殊的例子, 其细胞结合凝集素的性能可以预先估计, 如双花扁豆素之于血型 A 物质的特异性, 荆豆凝集素之于血型 O 物质 2-L-岩藻糖的特异性。然而在绝大多数情况下, 关于由凝集素所识别的碳水化合物决定簇的种类, 以及携带决定簇的分子的性质和机能, 完全凭实践经验去发现。

表 27-1 常见的凝集素一览表

凝 集 素	缩 写	特异性结合
花生 (peanut agglutinin)	PNA	D-半乳糖、Gal (1→3) -GalNAC
刀豆 (concanavalin ensiformis agglutinin)	ConA	D-葡萄糖、D-甘露糖
蓖麻 (ricinus communis agglutinin)	RCA	D-半乳糖、D-GalNAC>半乳糖
扁豆 (lens cuinaris agglutinin)	LCA	D-甘露糖、D-葡萄糖
豌豆 (pisum satiwum agglutinin)	PSA	D-甘露糖
菜豆 (phaseolus vulgaris agglutinin)	PHA	D-GalNAC
大豆 (soybean agglutinin)	SBA	D-GalNAC>>D-半乳糖
荆豆 (ulex europeaus agglutinin)	UEA	L-岩藻糖
麦胚 (wheat germ agglutinin)	WGA	D-GalNAC、NANA
(bandeiraea simplicifolia agglutinin)	BSA	D-半乳糖
双花扁豆 (dolichos bifows agglutinin)	DBA	D-GalNAC
槐 (sophora japonica agglutinin)	SJA	D-半乳糖、D-GalNAC

1. 作为细胞分化和成熟的标记 应用凝集素作为细胞分化的标志,在这方面的应用报告最多,而且研究比较集中于血细胞,特别是淋巴细胞的分群。如 Rose (1980) 等发现在小鼠胸腺皮质内不成熟的 T 淋巴细胞呈 PNA 阳性反应,在小鼠小肠集合淋巴小结的生发中心也发现有 20% 左右的 PNA 阳性反应细胞,后者是否属于不成熟的 T 淋巴细胞,是值得进一步研究的问题。Newman 等 (1979) 以荧光素标记凝集素 PNA,发现在大鼠乳腺上皮的不同分化时期显示不同的荧光强度。在不成熟的大鼠乳腺上皮细胞,荧光弱或无,随着性成熟期到妊娠期乳腺上皮荧光程度逐渐加强,而泌乳期荧光强度达最高峰。在皮肤角质细胞自基底向表层分化、成熟的过程中,细胞表面的碳水化合物的分布和性质都在改变。Brabed 等 (1981) 应用新生大鼠皮肤的实验表明,皮肤各层细胞分别与不同的凝集素相结合。麦芽素与角质化细胞相结合,蓖麻素与棘细胞和基底细胞相结合,而荆豆凝集素标记在棘细胞的表面。在肌原细胞的分化与成熟过程中, Winaod 和 Luzzati (1975) 注意到了类似的皮肤变化。

2. 作为细胞特殊类型的标记 Kivela 和 Farkkanen (1987) 发现在人视网膜, PNA 标记视锥细胞而不标记视杆细胞。在乳腺、乳腺上皮细胞呈 PNA 阳性反应而肌上皮细胞和间质细胞呈 PNA 阴性反应。以多种凝集素对小鼠、大鼠和兔的肾组织切片进行染色结果表明,刀豆素 A 和蓖麻素存在于肾脏的各部, PNA 和双花扁豆凝集素 (DBA) 主要分布于远曲小管和集合小管上皮细胞,荆豆凝集素 (UEA) 主要分布在血管内皮细胞,而麦芽素分布在肾小球。应用 DBA 对 RⅢ 和 DDK 品种的小鼠研究表明, DBA 主要结合在各种组织内毛细血管内皮细胞上,电镜观察显示 DBA 结合在内皮细胞的表面,有趣的是在 RⅢ 品系小鼠某些组织的内皮细胞显示肯定的 DBA 阴性反应,说明同一种属动物的血管内皮细胞也存在有组织特异性的差别。Streit 和 Kreutzberg (1987) 发现 *Griffonia Simplicifolia* 凝集素特异性标记面神经节内的小胶质细胞,其他类型的胶质细胞如星形胶质细胞 (astrocyte) 等都显示阴性反应。在切断面神经后,增殖的小胶质细胞对 *Griffonia Simplicifolia* 凝集素的反应加强,免疫电镜观察表明,凝集素主要沉积在细胞膜或小胶质细胞突起的轴膜表面,特异性结合糖基是 α -D-半乳糖。上海医科大学附属肿瘤医院免疫病理室应用 12 种凝集素 (表 27-1) 对人胚胎及各种正常组织进行了系统的凝集素受体的定位研究,结果表明,凝集素受体的分布并无既定规律可寻。如胃粘膜主细胞为 PNA 受体,而壁细胞为 BSA 受体,双花扁豆受体 (DBA) 主要出现在大肠部分。

3. 在肿瘤中凝集素结合的改变 肿瘤细胞伴有细胞膜的改变,细胞膜上的糖基也会产生相应的变化,可用凝集素检测出来。大量研究发现,凝集素可作为肿瘤组织源性的标记、肿瘤特异性诊断的标志、肿瘤恶性的标记和不同肿瘤的分化标记。如张华忠等 (1987) 报道 115 例胃癌标记 PHA 阳性率高达

90.43%，而正常胃粘膜基本是阴性，故认为 PHA 是胃癌的诊断性标志。BSA 对乳腺恶性肿瘤阳性率达 79%，而对良性病变均呈阴性反应，提示 BSA 可能为乳腺恶性肿瘤的相关标志。凝集素还有助于判别肿瘤的组织类型，如神经系统星形细胞瘤 ConA 阳性、小胶质细胞瘤阴性、肾腺癌 UEA1 阴性、透明细胞癌阳性。

三、凝集素在免疫细胞化学中的应用

凝集素可为荧光素、酶和生物素等所标记，分别进行下列染色法：

1. 直接法 标记物直接标记在凝集素上，使之直接与切片中的相应糖蛋白或糖脂相结合。

(1) 切片脱蜡至水；

(2) 凝集素标记物 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)，室温，30 min；

(3) TBS 洗 3 次，每次 2 min；

(4) 如为荧光素标记物，封片用荧光显微镜观察；如为酶标记物，则应依次进行呈色、脱水、透明和封固后在光学显微下观察。

直接法的优点是简便，目前商品用的凝集素药盒已能购得，但灵敏性不够高。

2. 间接法 将凝集素直接与切片中的相应糖基结合，而将标记物结合在抗凝集素抗体上。

(1) 脱蜡至水；

(2) 用含 3% 的 H_2O_2 的甲醇阻断内源性过氧化物酶 10 min；

(3) 凝集素稀释液 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 孵育 30 min；

(4) TBS 洗 3 次，每次 2 min；

(5) 用标记了的抗凝集素抗体 (1:100) 孵育 30 min；

(6) TBS 洗 3 次，每次 2 min；

(7) 呈色、脱水、透明、封片；

(8) 观察。

间接法染色还可进一步改良为三步法和抗生物素-生物素凝集素法。三步法：即在凝集素孵育后，接着用抗凝集素抗体孵育，再用标记了的抗-抗凝集素抗体孵育，层层放大，进一步提高其敏感性。PAP 复合物也可作为标记物标记在抗-抗凝集素抗体上。抗生物素-生物素凝集素法：用结合了生物素的凝集素孵育切片后，TBS 洗后再以抗生物素-标记物与之结合。间接法较直接法和直接法敏感性高 5~10 倍或更多一些，但必须购买或自制抗凝集素抗体。

3. 糖-凝集素-糖法 本法是利用过量的凝集素与组织切片中特定的糖基相结合。经冲洗后，凝集素上还存在未被占用的结合部位，将这些部位与有过氧化物酶标记的特异性糖基相结合，形成一个三明治样的糖-凝集素-糖的结合物。

(1) 脱蜡至水；

(2) 用含 3% 的 H_2O_2 的甲醇阻断内源性过氧化物酶 10 min；

(3) 用 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的凝集素孵育 30 min；

(4) TBS 洗 3 次，每次 3 min；

(5) 用 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HRP 标记的糖液孵育 30 min；

(6) TBS 洗 3 次，每次 3 min；

(7) DAB 呈色、脱水、透明、封固。

本法特异性强，灵敏度高，因为这不像抗生物素-生物素法那样要改变凝集素，又不需要像抗体那样要制备抗体。HRP 本身含有甘露糖，能与刀豆凝集素 A、扁豆凝集素和豌豆凝集素结合。但对其他的凝集素，本法目前普及还有一定困难，因为要将过氧化物酶结合到其他凝集素上，就需要将一个适当的碳水化合物基团嵌入过氧化物酶，称为糖基化 (glycosylation)，方法虽不复杂，但需一定的试剂和设备。

商品化能提供的糖基化过氧化物酶品种尚有限。

4. 注意事项

(1) 凝集素需要重金属离子维持其活跃的结合部位, 如果金属离子耗尽了, 就会影响凝集素的结合能力。因此, 有作者主张用 TBS 作为缓冲液, 内加微量的金属, 配方是: Tris 60.57 g, NaCl 87g, H₂O 加至 1 000 ml, 其中含 CaCl₂、MgCl₂ 各 0.01 mmol/L 或在进入凝集素孵育前, 先用该液孵育, 以增强凝集素结合力。

(2) 和其他抗体血清应用一样, 应用每批新的凝集素实验时, 都先要用缓冲液稀释成不同等级, 如 8, 16, 32, 64, 125, 250, 500, 1 000 μ g/ml, 经染色选择最佳稀释度。

(3) 有作者认为阻断组织内源性过氧化物酶所用的 H₂O₂ 对碳水化合物有影响, 可能改变凝集素的结合形式, 因此, 应尽量少用或不用, 但也有报道认为在实验过程中影响不明显。

(4) 有学者认为凡经固定的组织切片, 不论是石蜡包埋切片或冰冻切片, 都有可能使组织中抗原隐蔽, 为了暴露隐蔽了的碳水化合物基团, 主张在凝集素孵育前用酶处理切片, 常用胰蛋白酶液 (配制见附录二) 进行适当的孵育。

(5) 已知哺乳动物的质膜含有占蛋白总量的 1%~10% 的碳水化合物, 它们以寡聚糖 (oligosacchride) 糖脂, 并主要以糖蛋白的形式存在, 糖蛋白线性的或分支的旁链可能含有两个到多个单糖残基, 通常有两种或更多的单糖, 在单糖单位末端常常是一个带负电荷的 N-乙酰神经氨酸的残基, 一个唾液酸 (siallic acid)。有作者在凝集素实验中常用神经氨酸酶 (neuramidinase) 分解细胞表面的唾液酸或神经氨酸, 以暴露出隐蔽的能与聚集素结合的次终末的碳水化合物。配制方法是将神经氨酸酶用醋酸缓冲液 (含 2% 牛血清白蛋白) BSA 配成 0.5 μ g/ml。切片脱蜡后进行酶消化的过程中, 将该组织切片置于上述配制液中, 在湿盒内, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。用缓冲液洗后, 进行凝集素染色。

(6) 对照试验 和其他组化染色一样, 凝集素染色也需要设对照试验 (最好在相邻切片进行)。由于凝集素具有单糖特异性, 如果外加相应的糖, 把凝集素的结合部位占有了, 凝集素就不能再与组织中的糖基相结合了。一般采用的方法是将凝集素预先与相应的糖 (0.2 mol/L) 在室温孵育 30 min, 使之占有凝集素结合部位, 再将此液代替凝集素进行孵育, 结果应为阴性。在某些情况下即使提高糖液的浓度也不能达到完全的抑制。这时, 只有用与凝集素有高亲和力的寡聚糖代替或将切片预先用相应的糖苷酶孵育去除特异性糖基。

四、HRP 标记凝集素及凝集素抗体的制备

1. HRP 标记凝集素法 适用于小量的凝集素标记 (Ponder 1983)。

(1) HRP 的活化 将 10 mg HRP (Sigma, Type VI) 溶解在 1 ml 0.3 mol/L 的碳酸氢钠溶液中 (1.25g/50 ml)。加 50 μ l 含 1% 氟二硝基苯的无水乙醇溶液, 室温轻度搅拌 1 h。加 1 ml 含 0.06 mol/L 的过碘酸钠的蒸馏水 (0.62g/50 ml), 室温下轻度搅拌 30 min。在室温下加两滴 0.16 mol/L 乙二醇, 轻搅 1 h。用 Sephadex G-25 装成小柱, 用 0.3 mol/L 的碳酸氢钠溶液, 使含 HRP 的混合液过柱。

(2) 结合 正常条件下, 可用凝集素及过氧化物酶各半量, 但其比例可根据需要调整, 以 10 mg 凝集素溶解在 25 ml 的重碳酸盐缓冲液里, 加到“活化”的 HRP 中去, 这样得出的凝集素浓度大约是 0.3 mg/ml, 可加进 0.1 mol/L 相应的特异的糖, 以保护凝集素结合时的结合部位。糖在下步透析或层析时去掉。在室温下轻搅拌, 结合 3 h。加入 1 mg 硼氢化钠, 室温下作用 1 h 以稳定结合物活性。用 1N HCl 调整 pH 至 6.4, 留置室温下过夜。

(3) 纯化 用适当的凝胶层析柱如 Sephadex G-200、Saphacryl-300 层析法将游离的凝集素、游离的过氧化物酶和高分子量的成分从结合物分离出去, 包括抑制性的糖也在此时分离出去。提纯后的结合物在 280 nm 和 403 nm 波长处测量其吸光率。用 1%BSA 先通过 0.22 μ m 的微孔过滤器, 以确定被结合的凝集素是否被吸附在滤器中, 然后上述结合物经过该微孔过滤器过滤到一个无菌瓶中。加入叠氮钠, 浓度

1:1000, 保存于 4℃ 备用。

2. 抗凝集素抗体的制备 抗凝集素抗体的制备法与一般免疫血清制备大致相同。所不同的是: 凝集素具有较强的毒性, 易使被免疫动物发病或甚至死亡。解决的方法是经处理使凝集素变性, 从而减低其毒性, 但同时要保证其抗原性不受或少受破坏。要设法阻断凝集素的糖结合部位, 以减少对这些部位的抗体的产生, 解决的办法是预先以相应的糖阻断这些结合部位。Leathem 和 Atkin (1982) 设计了一个办法, 他们首先应用琼脂糖 (Sepharese) 珠, 珠上有一系列共价糖的附着, 这些糖可阻断凝集素结合部位, 这种糖珠有商品供应 (Sigma 公司), 每 1ml 糖珠能结合大约 12mg 凝集素。其次用加入甲醛和加热的方法使凝集素变性, 毒性减低而不影响抗原性。具体操作如下:

(1) 1 ml 琼脂糖-半乳糖珠与 1 mg 花生凝集素相结合, 室温 1 h;

(2) 加入 10 ml 10% 甲醛液, 在水浴中加热到 60℃, 1 h;

(3) 用盐水离心洗珠, 将珠分成以 10 μl 为单位的若干小份, 保存在 -20℃;

(4) 皮下多处注射两只家兔背部, 每次注射 100 μl, 每隔三周注射一次。取血 40~50 ml, 保存在 -20℃ 备用。

第四节 免疫细胞化学技术的某些进展

免疫细胞化学技术仍在不断地改进和完善中, 新的技术方法也不断出现。除目前国内已开始应用的免疫金技术和免疫金银技术外, 新的免疫细胞化学技术还有半抗原交联抗体法和分子杂交免疫细胞化学技术。本节仅简要介绍半抗原交联抗体技术。

近年来, 为提高敏感性和减低非特异性染色, 有些学者在常规免疫细胞化学技术的基础上, 发展了半抗原交联抗体法, 可作免疫荧光或免疫酶染色。本法的基本原理是应用半抗原标记第一抗体。常用的半抗原有阿散酸, 即对氨基苯砷酸 (Arsanilic acid, ARS)、对氨基苯酰甘氨酸 (P-aminobenzoyl glycine)、亚对氨基苯酰甘氨酸 (NP-aminobenzoyl glutamic acid) 和二硝基苯氨基丙腈亚胺酸酯 (dinitrophenyl aminopropionitrile imido ester, DNP), 通过酰胺化反应把半抗原结合到抗体分子上。在间接法 (二步法) 中, 先以半抗原标记的特异性抗体 (第一抗体) 孵育切片, 然后加入标记的抗半抗原的标记抗体 (标记物可为荧光素或酶) (图 27-4)。在 PAP 染色 (三步法) 中, 先用半抗原标记的第一抗体孵育切片, 再加未标记的抗半抗原特异性抗体作为桥抗体, 第三步加半抗原交联的 PAP 与之反应, 并作酶的呈色反应。

第一和第三抗体分别为半抗原标记的特异性抗体和以半抗原标记的抗酶抗体制备的含半抗原的 PAP 复合物。本法具有许多优点, 主要是: 敏感性高, 由于本法是通过酰胺化反应标记半抗原, 对抗体活性损失极小。抗体保留较高的活性, 能结合大量的半抗原, 平均每个球蛋白分子可同时结合 20 个半抗原分子, 每个半抗原又可用抗半抗原抗体相结合, 特异免疫反应明显放大。其敏感性明显高于常规的免疫酶和免疫荧光染色技术, 特别有助于发现滴度低的同种抗血清和含抗原量较少的组织, 可用于双重免疫染色。利用两种交叉反应的半抗原如阿散酸和对氨基苯酰甘氨酸分别标记来自同一种动物的两种特异性 (第一抗体) 血清, 应用两步法或三步法, 即可在同一张切片内同时显示两种不同的抗原。由于特异性强、敏感性高, 因此背景染色低。

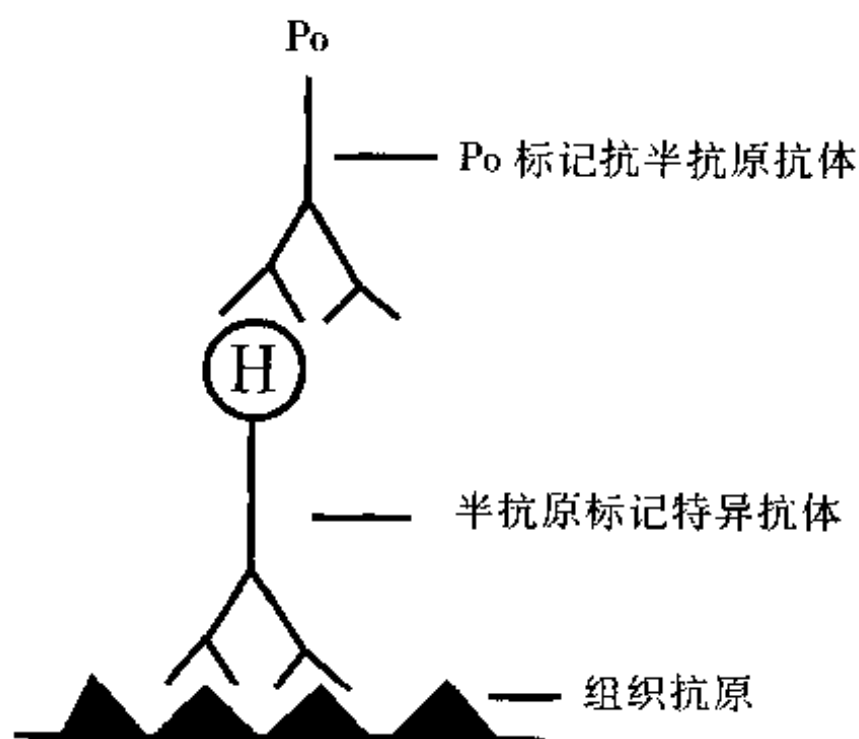


图 27-4 半抗原标记抗体酶技术——二步法

第四篇

共聚焦显微镜技术在植物学研究中的应用

第二十八章 植物细胞样品制备

激光扫描共聚焦显微镜技术 (laser scanning confocal microscopy, LSCM) 已成为研究结构与功能关系的一种有力武器, 它的广泛应用必将在植物细胞研究中掀起一场革命。激光显微技术的应用范围包括: 具有大液泡的表皮细胞胞间微管三维结构 (3D) 重建; 测定玉米芽鞘细胞在向光性和向心力的作用下胞质中 Ca^{2+} 浓度的变化; 研究静息情况下 *arabidopsis* 根部共质的韧皮部连接。激光共聚焦显微镜技术的最大优点在于它能纠正聚焦不准, 从而得到清晰的三维图像。植物细胞比较大 (几百个微米)、比较厚, 所以在进行 3D 结构重建时, 常规显微术受到视野宽度的限制, 而且要求切片的直径要小, 细胞必须是扁平的、二维的, 而激光共聚焦显微术不受这些条件的限制, 因而可得到理想的组织光学切片。更重要的是, 常规显微术还存在聚焦不准的缺点, 光线难以穿过较厚的切片, 而激光共聚焦则无此缺点。

本章节主要讨论两方面的内容: 在进行激光共聚焦制备样品过程中植物细胞具有哪些特点, 同时也为快速开发这一新技术提供一些方法和步骤。因为几乎所有的生物激光扫描共聚焦术都是进行免疫荧光染色的, 所以本章节主要讨论荧光图像的获取。

第一节 植物细胞的特点

一、细胞壁

细胞壁基本是由多糖和蛋白组成的。细胞壁的主要成分是纤维素微丝, 以高度有序的方式排列。纤维素微丝是通过半纤维素、果胶和蛋白相互联系的, 这一结构使得细胞壁胞外基质的厚度达 100~200 μm , 可抵抗 0.3 MPa 的压力。据估计胞外基质的孔径严格限制直径大于 5 nm 的分子通过, 这样对于抗体或核酸探针的穿透造成严重的障碍。解决探针穿透问题可通过两个思路加以解决: 第一种方法是切片, 这样可忽略探针穿透细胞壁的问题; 第二种方法是加入特定的酶, 如纤维素酶、半纤维素酶或果胶酶等对细胞壁进行降解。酶解的方法很有效, 但要注意处理的时间要短, 尽量使造成的细胞形态的损伤和细胞分离最小化。另外, 要在酶液中加入蛋白酶, 这样做的目的是使细胞壁足够疏松, 有利于探针的穿透而不造成结构性的破坏。植物细胞壁降解酶短时间处理植物细胞会增加抗体穿透组织的能力, 酶的纯度和特异性对这一步骤会有影响, 有时会造成对非特异性组织的损伤。另外也可加入去污剂来分解组织材料。

除了多糖和蛋白外, 细胞壁还含有蜡质物质如角质 (特别是表皮细胞) 木质素。对细胞而言, 这些物质是很好的第一道防线, 以防止病原体的侵入和水分的流失, 但同时它们也限制了固定剂和探针的穿透。在进行组织和器官切片时, 真空渗入可帮助固定剂完全穿透组织而促进固定。另外, 利用非选择性的去污剂如 1 g/L 吐温 20 或 5 g/L Triton X-100 对细胞壁处理 10~15 min 也可促进穿透。

最后一个值得注意的问题是细胞壁的自发荧光问题。在初生细胞壁中自发荧光的变化具多样性的, 而在次生细胞壁 (如木质层) 的发生则很平均。同时, 荧光的波长相对较宽, 因此很难去除。产生荧光的原因还不很清楚, 它可能是由酚物质引起的。

二、液泡

液泡具有一系列功能,包括:维持细胞形状,提供细胞扩张的必需力以及作为选择性分子的储存库。液泡的尺寸大小依赖于细胞的发育阶段。快速分化的细胞含有许多小液泡,所以液泡与胞质的体积之比相对较低。一旦细胞停止分化,小液泡融合为一个大的中央液泡。大多数处于成熟期的细胞停止分化,则液泡与胞质的体积之比相对较高。对于显微镜学家而言,植物细胞中液泡的存在有几个含义,在固定过程中保持固定剂渗透压的平衡以及在包埋过程中防止细胞扁平化。对显微镜学家来说,应尽量在显微镜下研究活细胞,必须防止因细胞变干而导致膨胀所产生的细胞行为发生变化。下面将简要讨论关于如何在显微镜下保持活细胞的形态问题。

研究活细胞需特别注意的问题是液泡对染料的摄入问题,尤其是在进行染料的定量测定时。许多研究者指出,当利用 Ca^{2+} 指示剂 Fura-2 测定时,更应注意此问题。指示剂可结合一个高分子量的葡聚糖,这样可防止染料穿透液泡膜,也可进行染料比率的测定。染料在激发态或发射态对离子的结合分别有一个波峰,测定结合态与非结合态的染料的比率,这样液泡对染料的摄入就变得不重要。若是不考虑定量测定的方法,测定对照的水平就变得很关键。

三、叶绿体

尽管叶绿体在光合作用中吸收可见光(叶绿素 b 在 430、454、595 和 643 nm 处有吸收峰)已是人所共知,但对于叶绿素可在红光中发射荧光却并不是都知道的。叶绿素的激发波长和发射波长与罗丹明型染料相似(激发波长在 541~570 nm;发射波长在 570~595 nm 处),在选择合适的荧光染料时应注意。所以在植物材料中,荧光染料一般选择 FITC,它的激发波长在蓝光区(大约 488 nm),而发射波长在绿光区(大约 520 nm)。当以蓝色光激发时叶绿体也发射荧光,但荧光为红色,这可与荧光染料从绿光区发射的荧光相区别。在有些情况下,荧光染料和叶绿素之间的矛盾可用黄化组织来处理或利用缺乏叶绿体的组织如根部或花斑组织白的部分切片。含叶绿体的组织需要利用红光区发射荧光的荧光染料时,可利用二重过滤法,如在 575 nm 处过滤掉叶绿素的荧光而只保留罗丹明染料的荧光。

第二节 材料和方法

一、材料

除非特别指出,以下试剂均购自 Sigma 公司。

1. 固定剂 固定剂的选择范围很宽,但它们一般以甲醛作为交联剂。使用时甲醛浓度都在 40 g/L,但一般都配制成 80 g/L,使用时再加入 2 倍的缓冲液即可。制备 80 g/L 的甲醛液时,称取 0.8 g 的多聚甲醛置于含搅拌棒的小杯中。注意,称取多聚甲醛时应在通风橱中进行。再加入 10 ml 的水,上覆一层油或脂类物质。将含甲醛的小杯置于通风橱中加热至 65℃,时间为 10~15 min。然后再滴入 1~2 滴 1 mol/L 的 NaOH 即可。配制好的溶液应清澈透明。

(1) 固定液 固定液 1: 4% (w/v) 的新配制的甲醛液 (1 ml/L 戊二醛、0.25 mol/L 甘露糖、50 mmol/L 磷酸钠); 固定液 2: 40 g/L 的新配制的甲醛液 (1 ml/L 戊二醛、27.5 g/L 的蔗糖、10 ml/L 乙二醇 P-40 (NP-40) 用 PEM 50:5:5 稀释); 固定液 3: 40 g/L 的新配制的甲醛液 (1 ml/L 戊二醛、50 mmol/L PIPES (pH6.9)、1 mmol/L MgSO_4 、5 mmol/L EGTA、10 ml/L 甘油); 固定液 4: 以 PEM 50:5:5 新配制的 40 ml/L 的甲醛液 (2 ml/L 的 NP-40); 固定剂 5: 以 PEM 50:5:5 新配制的 40 ml/L 的甲醛液 (1 ml/L 戊二醛、100 ml/L DMSO、1 ml/L 酶液-20)。

(2) 酶液注意,淀粉酶 (driselase) 来自于工厂生产的淀粉颗粒,先将淀粉颗粒配制成 20 g/L 的溶

液,离心,取上清液,可置于-20℃条件下保存数月。

酶液 1: 5 g/L 的纤维素酶 RC [0.5 g/L 果胶酶 Y-23 (Seishin Pharmaceuticals, Tokyo)、5 g/L Triton X-100、0.25 mol/L 甘露糖、1 mg/L 以 PEM 50:1:1 缓冲液配制的蛋白酶抑制剂 (如糜蛋白酶抑制剂和 (或) 抑胃肽酶)]; 酶液 2: 5 g/L 的纤维素酶 RC-10 [0.5 g/L 果胶酶 Y-23, 1 ml/L 以 PEM 50:5:5 配制的 Triton-100]; 酶液 3: 1 g/L 的纤维素酶 RC (0.1 g/L 以 PEM 50:1:1 配制的果胶酶 Y-23); 酶液 4: 0.5 g/L 的纤维素酶 RS (0.25 g/L 果胶酶 Y-23, 1 g/L 以 PEM 50:5:5 配制的 drisselase)。

(3) 多聚-L-赖氨酸 为使细胞贴壁,应选用分子量大于 250 000 的多聚-L-赖氨酸。将其配制为 1 mg/ml 的水溶液,储存于-20℃下,解冻的部分可在 4℃条件下保存 2 周。刚出厂的载玻片不能直接用于实验,应先用去污剂浸泡,再以大量的纯净水冲洗,然后置于烘箱中烘干。使用时以棉签蘸以多聚-L-赖氨酸涂抹。

(4) APTES APTES (Sigma) 是一种粘合剂,可将组织粘得非常牢固,在原位杂交和抗体结合实验时可获得较低的本底背景。首先应先将载玻片用去污剂进行处理,再置于丙酮液配制的 20 g/L 的 APTES 中浸泡 10 s (长时间的浸泡会导致本底增高),然后用丙酮简单冲洗,晾干。这样处理的载玻片可使用一个月左右。使用前先将载玻片置于磷酸盐缓冲液 (PBS) 配制的 25 ml/L 戊二醛浸泡至少 30 min,最后再以纯净水冲洗,晾干。

(5) 切片处理 玻片以 950 ml/L 的乙醇冲洗,晾干;粘以粘附液 [取 500 ml 水加热,加入 2 g 明胶,待明胶溶解后,加入 0.2 g 明矾类色素 (如硫酸铬钾) 进行搅拌,待混合液冷却后,加入叠氮化合物配制成 2 g/L 的溶液,过滤后储存于冰箱中,每次使用前过滤];在 60℃条件下烘干。

(6) 封固剂 30 g/L 的 BSA、2 ml/L 的 NP-40,以 PEM 50:5:5 配制。

(7) 磷酸盐缓冲液 (PBS): PBS 配方很多。一般情况下,配制好的 PBS 液应保存 4℃条件下,但如加入叠氮化合物可置于室温保存。下面仅介绍两种配方。

pH 7.4 的 PBS: 8 mmol/L Na_2HPO_4 、1.47 mmol/L KH_2PO_4 、137 mmol/L NaCl、2.68 mmol/L KCl,调整 pH 至 7.4。

pH 8.0 的 PBS: 4 mmol/L Na_2HPO_4 、2 mmol/L KH_2PO_4 、140 mmol/L NaCl、3 mmol/L KCl,调整 pH 至 8.0。

(8) Tris-缓冲液 (TBS) 25 mmol/L Tris-HCl (pH 7.4)、140 mmol/L NaCl、3 mmol/L KCl。

(9) 生理缓冲液 (PB) 100 mmol/L 乙酸钾、20 mmol/L KCl、20 mmol/L HEPES,以 KOH 调整 pH 至 7.4,1 mmol/L MgCl_2 、1 mmol/L ATP (双钠盐)、1% (v/v) 硫代乙二醇、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑蛋白酶肽、0.5 PESF。

(10) PEM 缓冲液 PEM 缓冲液指的是 PIPES (pH 6.9)、EGTA 和 MgSO_4 三者的混合物。因为由于不同的使用者使用目的不同,所以这三者的比例也有所不同。50:5:5 和 50:1:1 指的是三者按照不同的毫摩尔浓度比例配置成的缓冲液。PEM 缓冲液应保存在 4℃条件下。

(11) 枸橼酸钠盐缓冲液 (SSC) 1× SSC: 150 mmol/L NaCl、15 mmol/L 枸橼酸钠。使用时用纯净水配成 20×的缓冲液。

(12) 转录混合液 500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ CTP (钠盐; Pharmacia)、500 $\mu\text{mol}/\text{L}$ GTP (钠盐; Pharmacia)、250 $\mu\text{mol}/\text{L}$ BrUTP (钠盐; Sigma)、125 $\mu\text{mol}/\text{L}$ MgCl_2 、100 U/ml RNA Guard (Pharmacia),以生理缓冲液配制。

(13) 抗体 抗体在使用时应参考厂家的建议,但一般都配制成 1:100 或 1:400 的稀释液。为防止非特异的结合,抗体都用 BSA 稀释为 3% 的溶液。另外,抗体还存在穿透的问题,所以一般都选用 F(ab)_2 片段而非完整 IgG。抗体孵育一般都不采用与脊椎动物相同的 37℃ 条件,而是在室温条件下或在 4℃ 条件下孵育过夜。为防止抗体挥发,一般孵育时都是置于潮湿的小盒中,小盒上盖以湿纸。最后,建议载玻片避光以使在二抗孵育过程中荧光染料的褪色降低到最低程度。

(14) 原位杂交时探针混合液的配制 200 $\mu\text{g/L}$ 地高辛或生物素标记的 RNA 探针、1 mg/L 含有未处理片段的从质粒中转录出的未标记的 RNA、500 ml/L 去离子化的甲酰胺、100 g/L 的葡聚糖硫酸钠、300 mmol/L NaCl、10 mmol/L PIPES (pH8.0)、1 mmol/L EDTA。

(15) 荧光封固剂 现在市场上有许多封固剂包括 Citifluor (Agar Scientific, UK) 和 Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough, UK)。以甘油为主要原料含有抗褪色剂如 p -苯二胺-HCl 是目前广泛应用的一种。最好的办法是将载玻片置于封固剂中过夜, 这样可使抗褪色剂自然穿透。另外, 可在使用前向封固剂中加入一种染色质染料如 DAPI (4, 6-diamidino-2-phenylindole) 或 Hoechst 33258 (同为 1 $\mu\text{g/ml}$)。封固剂一般都保存在 4℃ 条件下, 使用前再加入 p -苯二胺二盐酸盐。

二、方法

下面所选用的方法代表了大多数的植物材料 (从悬浮细胞培养到整个根皮组织) 和处理方法, 同时它们也可作为对相似材料处理的启发点。下面给出几种植物细胞的处理方法。

1. 植物悬浮细胞培养 以下步骤说明的是烟草 (*Nicotina tabacum*) 悬浮培养的细胞系 BY-2 微管的免疫定位。BY-2 细胞系广泛应用于研究微管胞质骨架。下列这些步骤参考 Kuss-Wymer 的方法并做轻微改动, 相同的步骤已被用于测定胡萝卜悬浮细胞中的微管。

(1) 将细胞样品转移到试管中。

(2) 100 rpm 离心 10~15 min。

(3) 去除多余的缓冲液再加入细胞体积的 2 倍大小的固定液 1。

(4) 固定 1 h。

(5) 去除固定液前沉淀细胞。

(6) 加入 3 倍细胞体积的 PBS, 再沉淀细胞。此时细胞可在 PBS 条件下保存数周而不会出现抗原的丢失现象。

(7) 取两液滴于含多聚-L-赖氨酸的载玻片上, 静置 10~15 min。

(8) 用拭纸拭去未粘附的细胞, 酶液 1 处理 4~10 min, 使细胞壁扩张, 利于抗体的穿透。

(9) 将载玻片浸于含 PBS (pH7.4) 的搅拌皿中 10 min 左右, 必要时下述步骤可在 4℃ 条件下过夜。

(10) 去除多余的 PBS, 加入以 PEM 50:1:1 配制的 30 g/L BSA 液处理 15 min, 以阻断非特异抗体的结合。

(11) 室温条件下在潮湿的小盒中加入以 30 g/L BSA 液稀释的抗-微管蛋白抗体 (如 YOL1/34, 购自 Sera-Lab, Crawley Down, UK) 或抗- β -微管蛋白抗体至少孵育 45 min。

(12) 新配制的 PBS 液冲洗 15 min。

(13) 去除多余的 PBS 液, 室温条件下加入 30 g/L 稀释为适当浓度的二抗, 处理至少 45 min。

(14) 新配制的 PBS 液冲洗 15 min。

(15) 去除多余的 PBS 液, 加入含抗褪色剂的荧光封固剂封固。

2. 表皮细胞的制备步骤 植物表皮细胞因为其独一无二的特点和性质受到植物生理学家的广泛重视。例如, 表皮细胞可特化为保卫细胞、毛状体和根毛细胞, 一些属种某些器官的表皮细胞与器官分离仍可正常发育, 按照这种方法对保卫细胞的行为已进行了广泛的研究。一般而言, 表皮由许多表皮细胞组成, 通常有 3 层皮层细胞。去皮后的表皮细胞会发生高度变异, 所以在使用之前要在显微镜下镜检。下面这些步骤是蚕豆 (*Pisum sativum*) 表皮细胞的微管蛋白的免疫定位的方法。蚕豆表皮细胞的细胞壁含蜡层, 很难穿透, 所以要用酒精进行简单处理。这些步骤已成功用于蚕豆茎表皮的手工切片。

(1) 选用具有弹性的刮胡刀片在茎的部分进行切割, 这样可暴露出所要取的茎部的大面积区域。然后再用刮胡刀片在茎的上部切割, 这样可得到一部分表皮, 否则整个茎部都会被剥离表皮, 用细镊子夹住被切断的表皮, 这样可使表皮与茎分离。

- (2) 将双面胶布粘在载玻片上,上面再粘一层胶布(粘面向上),然后将植物组织固定在上面。
- (3) 将载玻片浸入含 50 mmol/L 谷氨酸钾、0.5 mmol/L MgCl_2 和 2.75% 的蔗糖液组成的缓冲液中。
- (4) 95% 乙醇处理 20s。
- (5) 去除乙醇,再浸入步骤(3)所属的缓冲液中。
- (6) 用固定剂 2 将表皮完全覆盖至少固定 2 h,从这一步骤开始以及随后的孵育步骤,应将载玻片置于潮湿的小盒中,这样可防止样品变干,同时可保存酶蒸汽。
- (7) 去除固定剂,将载玻片置于含 PBS (pH7.4) 的搅拌机中冲洗 15 min。
- (8) 酶液 2 酶解 10 min。
- (9) 注意,去污剂的选择、酶解的时间与细胞壁和表皮细胞的厚度呈正相关。
- (10) PBS 冲洗 15 min。
- (11) 4℃ 条件下用抗微管蛋白的一抗 (30 g/L BSA 稀释) 孵育过夜,同时可加去污剂如 1 ml/L NP-40 增大抗体的穿透力。
- (12) PBS 冲洗 30 min。
- (13) 二抗 (稀释方法同一抗) 孵育 6 h。
- (14) PBS 冲洗 30 min。
- (15) 用含抗褪色剂的荧光封固剂封固。

3. 组织切片的免疫荧光标记技术 这部分主要论述植物根细胞经振动切片机切片后的免疫定位。振动切片机采用双面刮鬍刀片通过振动同时来回切割组织。典型的豌豆 (*pisum sativum*) 根切片厚度一般为 30~40 μm , 含两层细胞。振动切片机特别适合于切割致密、坚韧的组织如根尖等,而切割含液泡比例大的组织如叶片组织则很少成功。另外一些小根植物如小麦 *Triticum* 比大根植物如豌豆 *pisum sativum* 和玉米 *Zea mays* 等更难以切割成功。这种切片的方法与其他方法相比较有很大的优点:在 3D 结构和位置信息等方面都能保存完整。

步骤:

- (1) 截取发育的豌豆根尖 3~4 mm, 室温下固定于 40 ml/L 的以 PEM 50:5:5 配置的甲醛液中 1 h。
- (2) 以 PEM50:5:5 冲洗根尖部 15 min。
- (3) 振动切片,厚度为 30~40 μm 。
- (4) 将切片置于 APES 包被的多孔载玻片上风干。
- (5) 20 g/L (TBS 稀释) 的果胶酶 R-10 (Takult pharmaceutical, Tokyo) 孵育 1 h, 消化细胞壁。
- (6) 取载玻片用 TBS 冲洗 2 次,每次 10 min。
- (7) 加入 A 稀释的 30 g/L BSA (用 TBS 配制) 的一抗室温条件下孵育 45 min。
- (8) 依次用 TBS 冲洗载玻片 3 次,每次 10 min。
- (9) 室温条件下加入用 TBS 配制的 30 g/L BSA 进行稀释的二抗 45 min。
- (10) 再用 TBS 冲洗 3 次,每次 10 min。
- (11) 用 DAPI (1 mg/L) 染色切片 5 min。
- (12) TBS 简单清洗, vectashield 封固。

4. 组织切片的体外转录方法 下面这些步骤用于检测根尖细胞切片转录位点的定位。在下列步骤中材料不能进行固定,几个关键步骤一定要小心操作才能确保转录的光学检测。首先在材料的选择上十分严格,健康的、新近萌发的、生长完好的根才能用作实验材料。切片的制作过程包括从根尖细胞的切除、切片到渗透(允许底物渗入细胞)应尽可能快,理想的状况是不超过 5 min。所选溶液中的离子组成应尽可能与胞内的离子组成相近,这样才能确保在处理过程中, RNA 多聚酶仍能正常转录。切片孵育在可调整的三磷酸核苷酸 (BrUTP) 的转录混合液中,在这种情况下,任何加入的 RNA 多聚酶会继续转录缓冲液中的核苷酸,随后转录的核苷酸可被特异的抗体检测到。下列这些步骤主要参考 Hozak 的原始

方法并加以改进, 这些技术已成功地应用于豌豆 *pisum sativum*、玉米 *Zea mays*、黑麦 *Secale* 和小麦 *Triticum* 的转录实验中。

(1) 切取新发芽的根尖部 3~4 mm 长, 在振动切片机上封固、切片, 厚度为 40~50 μm , 置于含 1 mol/L 己烯乙二醇 (2-甲基-2, 4-戊烷) 的生理缓冲液 (PB) 中, 转移至组织处理装置上。

(2) 0.5 ml/L TritonX-100 的 PB 孵育 1 min。注意: 短时间的 Triton 处理有利于核苷酸的良好转录, 而长时间的处理则导致大规模的核苷酸转录。

(3) PB 冲洗 3 次, 大约 30 min。

(4) 根据渗透的程度, 在转录混合液中孵育 2~10 min。

(5) 处理同步骤 (3)。

(6) PEM 50:5:5 配制 40 ml/L 甲醛液固定 1 h。

(7) TBS 冲洗 10 min, 随后用双蒸水冲洗 10 min。

(8) 从组织处理装置上移去组织块, 置于 APTES 包被的多孔玻片上自然风干。

(9) 以 TBS 配制的 20 g/L 果胶酶 R-10 (Yakult, pharmaceutical, Tokyo) 处理切片 1 h。

(10) TBS 冲洗 3 次, 共 15 min。

(11) 一抗 [大鼠抗-BrdU (Boehringer Mannheim)、TBS 配制的 30 g/L BSA 按 1:20 比例稀释] 孵育 1 h。

(12) TBS 完全冲洗。

(13) 荧光二抗 [孵育 1h。Cy3-交联的驴抗鼠抗体]、用 PEM 50:5:5 配制的 30 g/L 的 BSA 按 1:100 比例稀释。

(14) Vectashield 或别的抗褪色封固剂封固。

5. RNA-地高辛或 RNA-生物素探针进行组织原位杂交 该部分主要讲述利用地高辛或生物素标记的 RNA 探针 (参考 Highett 的方法并加以改进) 检测原位杂交的根尖细胞, 也可以利用 DNA 探针进行检测。在进行原位杂交时应在热变性处理前加入探针。为了使该方法适合于不同种的植物, 酶解是十分重要的, 这样可保证探针完全穿透组织。为防止意外情况, 建议探针大小不超过 100 bp, 这样可保证探针良好地穿透组织。主要通过控制温度变化和洗脱液的离子强度来保证该过程的严格性。该方法已成功地应用于豌豆 *pisum sativum*、玉米 *zea mays*、黑麦 *secale*、小麦 *triticum* 和洋葱 *allium cepa* 等的实验中。主要实验步骤如下:

(1) 室温条件下, 用 PEM 50:5:5 配制的 40 ml/L 多聚甲醛和 1 ml/L 戊二醛混合液固定 (也可用 40 ml/L 多聚甲醛单独固定) 1 h。注意戊二醛虽可使组织保存完整, 但却使探针难以穿透。

(2) PEM 50:5:5 洗脱。

(3) 振动切片机切片, 厚度 30~40 μm 。

(4) 将切片置于 APTES 包被的多孔玻片上干燥。

(5) 用 PBS (pH8.0) 配制的新鲜 NaBH_4 液 (1 g/L) 处理切片 15 min, 吸出, 重复至少 3 次。该步骤仅用戊二醛固定时是必需的, 不用 TBS 而用 PBS 是因为 NaBH_4 与 Tris 可起反应。

(6) TBS 配制的 20 g/L 果胶 R-10 室温下孵育 1 h。

(7) TBS 洗脱 5 min, 再浸入 $0.1 \times \text{SSC}$ 中 5 min。

(8) 98°C 条件下 $0.1 \times \text{SSC}$ 液中孵育 5 min 后, 立即移入冰冷的 $0.1 \times \text{SSC}$ 中, 该步骤仅是用双标 DNA 时是必需的。

(9) 去除玻片孔中的表面脂质, 加入 10 μl 冰冷的探针混合物, 将玻片置于湿盒中 37°C 条件下过夜。

(10) 50°C 条件下, $0.1 \times \text{SSC}$ 液洗脱 1.5 h, 中间换液 3 次。

(11) 抗体检测: 去除多余的洗脱液, 用 TBS 配制的 30 g/L BSA 稀释成的抗体检测。按照生产商的要求稀释, 每次在室温下孵育 45 min, 用 TBS 完全洗脱。抗体检测项目为地高辛标记的探针: ①抗地高辛的鼠抗体 (与异羟基洋地黄毒苷元交联反应的抗地高辛的抗体, Sigma); ②Cy3-交联的鼠抗体

(Jackson immunoResearch Labs, West Grove, PA, USA)

(12) 生物素标记的探针: Extravidin Cy3-交联剂 (Sigma)。

(13) DAPI (1 g/L) 复染 3 min。

(14) TBS 洗脱, 然后用 Vectashield (Vector Laboratories, Peterborough, UK) 或别的抗猝死封固剂固定。

6. 根尖组织中微管和染色体的免疫定位 本部分主要论述对根尖细胞中微管的免疫定位。根尖细胞具有下列一些优点: ①含有高比例的完好的有丝分裂相; ②根尖细胞比较小, 无液泡, 可自然风干, 所以不像有液泡如悬浮培养细胞那样会破坏 3D 结构。该方法最早是由 Wick 等发明, 后经许多实验室加以改进而形成的。在实验时要想得到理想的结果, 应选用刚发芽的快速生长的根尖细胞。该方法已成功地用于许多双子叶和单子叶植物的研究中。

(1) 从籽苗中切取根尖部分。

(2) 室温条件下, 固定液 3 固定根尖组织 40~60 min。

(3) 去除固定液, PEM 50:1:1 缓冲液冲洗 3 遍。在 4℃条件下根尖组织可在缓冲液中保存数天甚至数周。

(4) 将根尖组织置于酶液 3 中 10 min。

(5) PEM 50:1:1 缓冲液冲洗 2 遍。

(6) 置根尖于浸湿的玻片上, 上盖一盖玻片, 用力挤压, 使之变扁。

(7) 轻移去盖玻片将干玻片置于 4℃过夜。也可用 L-Lys 包被的玻片粘附细胞, 所用时间与上述同, 如使用 L-Lys 包被的玻片则细胞不必变干。

(8) 置玻片于湿盒中, 加入 1 ml/L PEM 50:1:1 配制的 TritonX-100 酶解 10 min。

(9) 室温条件下加入 30 g/L BSA 15 min, 以阻断任何形式的水合醛形成。

(10) 去除阻断剂缓冲液, 加入抗微管蛋白的抗体 (用 30 g/L BSA 配制) 室温条件下放置 45 min。

(11) 用 PBS (pH7.4) 轻轻冲洗玻片上的一抗, 然后将玻片置于 PBS 中 15 min。

(12) 吸净玻片上的 PBS, 加入二抗 (30 g/L BSA 稀释) 孵育 45 min, 此过程避免光照。

(13) PBS 冲洗玻片, 如前述。

(14) 加入几滴含色素结合染料的荧光封固剂封固, 再盖上盖玻片。

7. *Arabidopsis* 根组织免疫荧光的整体包埋法 本部分主要论述对整体包埋的 *Arabidopsis thaliana* 根组织中蛋白质的免疫荧光定位。免疫荧光整体包埋法与激光显微术结合起来, 可对所有植物根组织中的高含量蛋白进行定位而无需切片。下面这些步骤主要是“U2B”剪接蛋白 (用 4G3 抗体检测) 的定位方法。

(1) 取发育 3 d 的籽苗用前述固定剂 4 固定 1 h。

(2) 先用 2 ml/L NP-40 的 PEM50:5:5 缓冲液冲洗 3 次, 每次 5 min, 然后单独用 PEM50:5:5 缓冲液重新悬浮培养。

(3) 切取根部, 移至 APTES 包埋的多孔玻片上使其风干。

(4) 酶液 4 消化根部 10 min。

(5) 用含 2 ml/L NP-40 的 PEM 50:5:5 缓冲液冲洗 6 次, 最后使其风干。

(6) 用阻断剂冲洗 90 min。

(7) 一抗室温下孵育 2 h 或 4℃过夜, 抗油小鼠 4G3 抗体 (Euro-diagnostica b.v., The Netherlands) 按 1:10 比例用 PEM 50:5:5 配制的 30 g/LBSA 稀释而成。

(8) 阻断剂处理 1 h。

(9) 室温条件下二抗孵育 2 h, 二抗为按 1:10 用 PEM 50:5:5 配制的 30 g/LBSA 稀释的 Cys-交联的驴抗鼠抗体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA)。

(10) 用含 2 ml/L NP-40 的 PEM 50:5:5 缓冲液冲洗 2 d。

(11) 若需染色用 DAPI (1 g/L) 复染, 然后用 Vectashield 封固。

8. *Arabidopsis* 根组织原位杂交的整体包埋法 下面论述的是对 *Arabidopsis* 根部组织中相对含量较高的 RNA 的原位杂交定位, 这些步骤主要参考相关文献。相比较而言, 这种方法已简单化而很适合原位杂交, RNA 探针技术就是随这种方法的产生而发展起来的, 而且所得到的图像几乎与免疫定位的结果一样清晰。

(1) 用固定剂固定发育 3 d 的籽芽。

(2) 甲醇冲洗 2 次, 每次 3 min; 然后在 -10℃ 条件下用乙醇冲洗 4 次, 每次 5 min。

(3) 用比例为 1:1 的甲醇/二甲苯冲洗 30 min。

(4) 乙醇冲洗 3 min, 后用甲醇冲洗 3 min。

(5) 用含 1 ml/L 吐温 20 的 PEM 50:5:5 缓冲液冲洗 2 次, 每次 5 min, 然后单独用 PEM 50:5:5 缓冲液重新悬浮。

(6) 切取根部组织, 移至 APTES 处理的多孔玻片中晾干。

(7) 酶液 4 酶解 10 min。

(8) 用含 1 ml/L 吐温 20 的 PEM 50:5:5 缓冲液冲洗根部组织 6 次, 晾干。

(9) 37℃ 条件下 40 mg/L 蛋白酶 K (含 1 ml/L 吐温 20 的 PEM 50:5:5 缓冲液配制) 处理 10 min。

(10) 用含 1 ml/L 吐温 20 的 PEM 50:5:5 缓冲液配制的 0.2 g/L 甘氨酸中和蛋白酶 K 5 min。

(11) PEM 50:5:5 缓冲液冲洗根部组织几分钟, 晾干。

(12) 用 PEM 50:5:5 缓冲液配制的 1 g/L NaBH_4 冲洗根部组织 4 次, 每次 15 min。

(13) PEM 50:5:5 缓冲液冲洗, 最后用 0.1 × SSC 冲洗。

(14) 加入探针混合物, 室温下孵育 24 h。

(15) 50℃ 条件下, 用 0.1 × SSC 冲洗 1 h。

(16) 用含 1 ml/L 吐温 20 的 PEM 50:5:5 缓冲液冲洗 2 次, 晾干。

(17) 阻断液处理 90 min。

(18) 室温条件下一抗孵育 2 h 或 4℃ 条件下过夜, 一抗由大鼠抗地高辛抗体用 30 g/L BSA 按照 1:5 000 稀释而成, 其中 30 g/L BSA 用 PEM 50:5:5 配制。

(19) 阻断液处理 1 h。

(20) 32℃ 条件下二抗孵育 2 h, 二抗 Cy3-交联的驴抗鼠抗体, 用 30 g/L BSA (w/v) 按 1:100 比例释, 其中 30 g/L BSA 用 PEM 50:5:5 配制。

(21) 含吐温 20 的 PEM 50:5:5 冲洗 2 d。

(22) Vectashield 封固。

9. 利用 LSCM 研究活细胞 利用 LSCM 研究活细胞有利于理解生命的过程, 我们将向有兴趣进行该项研究的人员提供一些思路。在活细胞研究中所利用的可视化荧光探针, 取决于细胞的类型和所利用的探针的类型, 所以没有一个通用的步骤。以下将从四个方面论述活细胞成像技术, 以及每一个方面可选择的、变通的步骤。

(1) 固定 若细胞是可视化的, 那么第一步就是固定细胞或组织使其保持活性。对于有效固定的最大挑战是在保持细胞处于健康状态的同时, 还要保持细胞在相对环境中处于同一个部位。普遍的做法是利用琼脂糖包埋样品, 低熔点的琼脂糖可使对细胞的伤害程度和引起的热休克反应降至最低程度。在进行琼脂糖微注射时要使细胞保持恰当的位置, 增大琼脂糖在胞体内的百分率同时尽量降低注射针的运动性, 使这二者保持平衡。这项技术已成功用于原生质、花粉管、雄蕊毛和根毛的研究中。

另一种固定的方法是利用粘性胶布, 通过双面胶布 (疏水型如 Cellux) 附着于载玻片上, 粘着面向上, 再将样品粘于胶布上。在样品上不覆盖任何东西使其晾干或以惰性油如 Voltalef PCTFE oil (Atochem.Pierre-Benite, France) 覆盖, 惰性油的作用是防止组织变干同时增大样品系统的光学性能。这

种方法仅限于处理干燥或湿度较小的材料,但须注意的是组织上可覆盖透明溶液。利用这种方法对雄蕊毛和豌豆表皮条纹进行研究。还有一种相似的方法是利用不溶于水的生物惰性胶布如牙科医用胶布或修复科医用胶布进行固定。

(2) 如何使细胞保持活性且健康 检测细胞的健康状态最简单的方法是用显微镜仔细检查细胞。细胞器都具有独特的外形,在胞质中可观察到。当细胞发生病理变化时,细胞器的位置、形状,特别是细胞质丝和细胞核会发生变化,有时可观察到布朗运动。为使细胞在显微阶段保持健康的状态,必须使其处于适当的膨压范围内。利用压力微注射法处理样品时,针尖的注射液要缓慢减少,但要注意注入剂量的大小,否则会引起质壁分离(质壁分离指的是在显微观察时细胞壁与原生质分离)。在适当的压力下,将细胞置于缓冲液或包埋于凝胶中,使细胞保存在一定的膨压范围内。测定细胞的膨压可将细胞置于系列山梨糖缓冲液中进行。进行压力注射且不引起质壁分离现象发生时的压力即为细胞的膨压。有时即使细胞已被缓冲液包围,也会很快发生蒸发作用使溶液的浓度增大。一般来说,在较短的时间内(10~15 min)蒸发作用可忽略不计,但若是较长时间(>20 min),最好将样品置于湿盒中同时测定其膨压或使用灌流系统。

尽管膨压对于维持细胞的健康状态十分重要,但是还有许多因素包括缺氧、温度和光损害也需注意。对于一个开放体系而言,缺氧不是主要问题,氧气可扩散到缓冲液中再进入细胞,但对于封闭体系却应注意,应通过灌流系统供给氧气。由于室内温度很好控制,所以在显微观察阶段对温度的控制很少造成问题。尽管有时激光会产生一些热量,但可通过通风加以补偿。但如果样品包埋在琼脂或别的凝胶中,温度就成为一个引入注意的问题。植物细胞的部分区域由于激光辐射造成温度升高,因此会被高能量的激光严重损伤。当正在生长的花粉管顶端受到高剂量的紫外光照射时,花粉管长势变慢最后裂解。对于激光照射量大小,应是在得到清晰信号的同时最好采用最低剂量的光照。总之,在固定过程中保持细胞活性是最重要的。

(3) 荧光探针的导入 该部分主要讨论如何使探针导入到细胞中且同时保持其活力,关于这方面的论述可参考相关的综述。在此,我们将讨论主要局限于最为成功的两种方法上:可溶性探针的直接吸收法和微注射法。直接法具有几个优点:可同时标记多细胞;过程简单,不需任何特殊的设备。然而该方法局限于那些能直接吸收探针以及商品化的探针能穿透的植物细胞,抗体以及别的蛋白不能通过此方法进入细胞。微注射法可将抗体、蛋白质以及核酸等注入特定的细胞中。然而进行微注射的仪器昂贵,该技术需经大量练习才能掌握。

①可通透性探针的直接吸收法:一些脂溶性的探针很容易穿透细胞膜,负载探针的过程很简单,只需将细胞置于适当浓度的染液进行孵育。而对于在生理 pH 下,分子上具羧基基团的探针则不能穿透细胞膜,可采取乙酰甲基化的方法改变分子的带电性质使其穿透质膜,再依赖于胞质中的酯酶水解暴露出染料。这样就会存在一个问题,若在胞外发生水解或在胞内没有完全水解应该如何解决?我们可通过质子化的方法改变染料上羧基基团的带电性质,处理的方法是先将探针置于低 pH 条件下(pH 大约 4.5)引起染料质子化和膜透性增大,一旦染料进入胞质(pH7 左右)则质子脱落,从而染料在胞内裸露。这种方法常被称作酸化负载(acid-loading),已有几个实验室作过报道。但并不是所有的细胞都可忍耐酸碱度的选择压力,另外染料与细胞壁的紧密结合也是一个值得注意的问题。

②微注射法:微注射法有两种方法:离子注射法和压力注射法。离子注射法的原理是将一段电线插入,在细胞内液和注射液之间造成一个电势差,这样产生的微电流会将探针带到胞内,这种方法要求探针可带电且电量相对较小。就目前而言,该方法对大多数的蛋白质还无能为力。压力注射法的原理是先将注射液吸入注射管内,再利用液压使探针进入细胞。这样对于注射的探针类型几乎没有限制,从染料到蛋白质甚至到病毒颗粒都可进行注射。在进行压力注射时,细胞的容积会发生变化(增大),因此注射液的量应尽可能小,浓度要适当。基于这个道理,染料与蛋白质的比率应尽可能高,这样才能保证探针的正常功能。另外,微注射时的注射压力要求十分严格,因此对细胞膨压的控制就很重要。

③范例：标记的微管蛋白的微注射。下面举一个实例，选用罗明丹标记的豌豆茎表皮细胞的微管蛋白，借此说明前面已讨论过的注意事项以及还有哪些细节需要注意。首先切取豌豆茎的表皮组织，置于胶布上，注意表皮部分向上，再用胶布粘住防止脱落或移动。用一些胶布与表皮的长轴方向平行粘牢，这样就形成一个疏水性胶布做成的槽，槽内可放置缓冲液使组织湿润。缓冲液组成：50 mmol/L 谷氨酸钾、0.5 mmol/L 的 MgCl_2 以及 27.5 g/L 蔗糖。加入蔗糖是为了保持细胞的膨压。当不处于显微阶段时，将含有样品的载玻片放在表面皿中，上盖湿润的滤纸以防止水分蒸发。将样品先放置 15 min 再进行微注射，用油浸接物镜头 (Plan-NEOFLUAR 63/1.2) 观察表皮组织，选择好区域，该区域有许多细胞在流动，微管蛋白的渗入与胞质流动成正相关。一旦选定好注射的区域后，将油浸接物镜头换成长焦接物镜头 (Nilon Plan 40 \times /0.35 SLWD)。

从猪的脑组织中纯化微管蛋白，再参照标准方法用四甲基罗丹明进行标记。微管蛋白在室温下可自组装，操作时要在冰上进行，相应的注射针也应放在冰上以免微管蛋白在针尖处自组装。最好的办法是在注射时将纯化的蛋白置于冰上，而注射针大可不必置于冰上。对注射针的大小和形状的选择特别重要，一般选择形状锋利的、尺寸比较小的，特殊情况下，应选择直径较大不易堵塞的（一般外径为 750 nm 即可），注射植物细胞时容易造成注射针被细胞壁的成分堵塞。与注射水溶性液如染液相比较，注射粘性溶液如蛋白液应选用直径较大的注射针。一旦微注射针放置在固定器适当位置时，在培养皿中滴一滴 2 μl 的微管蛋白液针尖就会被吸满，将其轻吸入注射针中。若蛋白很容易被吸入注射针中，那么就很容易从注射针中吸出，这是有利的情况。经过几个小时的注射，我们发现将微管蛋白吸入到注射针中会越来越困难，在这种情况下应更换微管蛋白液，这提示旧的蛋白液中的微管蛋白发生了凝聚和自组装。

当注射针中充满微管蛋白液时，这时就要选定注射的位置。对于组织或细胞的几何位置应牢记在心，使注射针成浅角度会使注射液进入到胞质中，而使其成深角度则会使注射液进入到液泡中。表皮细胞比较扁平，所以注射针的角度并不重要。但若注射的对象是柱状细胞如雄蕊毛或丝状体，这就会有很大差别。细胞的某些区域利于注射，也就是说细胞在角落处有胞质囊的地方利于操作。一旦注射的部位确定后，将注射针沿轴向运动刺入细胞中。当注射针头进入细胞后用一定的反压是必要的，这样可避免由于细胞的膨压作用使胞质进入注射针头，这时一定剂量的微管蛋白就被注入到细胞中。经过 1~2 min 微管蛋白自组装后再将注射针作轴向运动从细胞中移去。在注射的过程中移去注射针是最危险的工作，如果注射针移去得太快，细胞就会被损伤，造成胞质溢出。在表皮细胞重新填封好后的 2 min 左右才能移去注射针。当然对于不同类型的细胞都有不同的要求，但只要熟练掌握一种类型细胞的注射方法后，对于别的类型细胞的注射就相对比较容易。

(4) 成像 本书的其他章节已讨论了不同的成像技术，在此就不展开讨论。活细胞的激光成像应尽量避免光损害。激光的强度应尽可能小，只要能看清样品就可以。在 Bio-Rad MRC-600 激光共聚焦利用快光子计数装置和 10% 激光能（氩/氦激光）照射间隔 3 min 扫描，已对微管蛋白重新定向观察了 1 个多小时。相信只要仔细操作，激光显微术将会成功地用于植物活细胞的测定。

第二十九章 植物细胞骨架研究

共聚焦显微镜具有较普通光学显微镜更高的分辨率，可以对较弱的信号进行图像的采集，并且可以对活细胞进行无损伤的测定以及进行三维图像的构建，因此在生物科学的研究中得到日益广泛的应用。本文将就共聚焦显微镜在植物细胞骨架研究中应用的技术和方法做一综述。虽然本文主要介绍植物细胞骨架研究中共聚焦显微镜的应用，但所述技术方法在其他植物细胞的研究中也是基本相同的。我们期望通过对有关植物细胞骨架的共聚焦显微镜技术的介绍，能够对从事其他植物细胞生物学研究的工作者也有所帮助。

细胞质中的细胞骨架是指微管、微丝和中间纤维等在细胞质中形成的复杂的蛋白网络结构。在植物细胞的各种生理活动中，细胞骨架都具有非常重要的功能。例如在细胞分裂过程中，细胞骨架负责染色体的分离和新细胞板的定位；在细胞壁合成过程中确定细胞壁微纤丝的沉积方向；细胞质的组织以及细胞中的物质的运输和定位等。间接免疫荧光方法结合共聚焦扫描显微镜技术，极大地提高了我们对于植物细胞内细胞骨架的三维空间排布和动态的了解。特别是近年发展起来的显微注射细胞骨架探针以及利用基因重组技术表达 GFP-细胞骨架蛋白技术的出现，为直接观察植物细胞内细胞骨架的动态过程提供了可能。

第一节 植物细胞中细胞骨架结构的共聚焦显微镜观察

与普通荧光显微镜相比较，共聚焦显微镜可以取得更高质量的图像，特别是对一些荧光信号较弱的结构来说更是如此。一般来说，只要是进行荧光观察的工作就有可能采用共聚焦显微镜技术进行观察。当然在这里首先要考虑的是所观察的荧光性质，例如荧光所需的激发光波长是否符合共聚焦显微镜的激光波长。从总体上来说，共聚焦显微镜很可能在大部分的荧光观察、记录工作中取代传统的荧光显微镜观察。

细胞骨架是细胞中非常精细的细胞器结构，虽然早期的电镜工作在确定细胞骨架在细胞中的存在，以及在细胞骨架的微细结构方面做出了重要的贡献，但是用电镜观察整体细胞的细胞骨架反而较为困难。免疫荧光技术的应用使我们对整体细胞中细胞骨架结构，以及细胞骨架结构动态变化等方面的认识有了长足的进步。而共聚焦显微镜技术的应用又使我们对细胞骨架结构的观察达到一个前所未有的水平。

对植物细胞微管的共聚焦显微镜观察来说，最常用的染色方法是采用免疫荧光染色方法，有关的内容参阅相关章节。

一、植物微管列阵的观察

在植物细胞中，微管有规律的排列，形成微管列阵 (microtubule array)。在植物细胞周期的自然进程中会依次出现以下一些微管列阵，即间期周质微管列阵、早前期微管带、纺锤体和成膜体，这些不同的微管列阵在细胞周期中依次转换并在不同时期执行特定的功能 (彩图 25)。细胞间期的周质微管列阵通过控制细胞壁合成过程中微纤丝的沉积方向并进而控制细胞的生长；在细胞进入分裂期之前形成的早前期微管带则预示着细胞分裂面的位置；分裂期的纺锤体担负着染色体运动的功能；在染色体分裂完成后细胞新壁的形成过程中，成膜体参与新壁的建成。有关在细胞周期转换过程中微管的共聚焦图像的采集在

文献中有大量的报道,如利用共聚焦显微镜研究了小麦根尖分生细胞周期过程中各微管列阵及相互转换,采用同步化的烟草 BY-2 细胞研究了在细胞周期 M 期向 G₁ 期转换过程中周质微管的来源及组织,用放线酮对洋葱根尖细胞早前期微管带及前期纺锤体形成的影响所做的研究表明:放线酮处理导致早前期微管带变宽并能抑制前期纺锤体的形成等。有关这方面的文献相当广泛,在此不再做详细的叙述。

对于普通荧光显微镜来说,由于在焦平面以外的荧光都可以进入物镜而被观察到,因而产生很强的荧光背景,使需要观察的对象无法清晰成像。而共聚焦显微镜可以排除焦平面以外的荧光,使其无法通过针孔而被光电倍增管所接收,因此可以清晰地显示焦平面上的物像而避免荧光背景的干扰。因此共聚焦显微镜在研究细胞骨架分布,特别是细胞中不同部位的细胞骨架的相互关系中具有明显的优越性。

在有关植物细胞微管组织中心 (microtubule organizing center, MTOC) 的研究中,细胞核膜或核周被认为是存在微管组织中心的重要部位。过去的实验结果表明早前期微管带开始形成时,细胞核周微管大量出现,在早前期微管带出现之前,细胞核周微管是很少出现的。早期纺锤体也是在细胞核表面出现的,在极体的位置微管逐渐聚合且紧密地连在一块直到最后核膜消失。在细胞分裂期的晚期和细胞末期,微管又重新出现在细胞核表面,同时,成膜体已经开始形成,接着进行向心生长,直到最后胞质分裂完成时,成膜体消失。共聚焦显微镜技术在这方面的研究中发挥了重要的作用。细胞核表面可以作为微管成核位点在很多种植物材料中都采用共聚焦显微镜进行了研究,例如网球绣花菊胚乳细胞核、银杏及葫芦藓的花粉母细胞、洋葱根尖细胞、大叶杓兰以及 *Vigna* 的花粉等。利用指示中心体的特异性抗体 6C6 抗体并结合共聚焦显微镜观察,6C6 相关抗原定位在植物细胞的细胞核周围或花粉管的膜上。共聚焦显微镜还被用于采集多核胚乳 (syncytial endosperm) 中由细胞核辐射的微管,以及在蓝花小孢子母细胞胞质分裂过程中形成的以核为中心的微管列阵。

二、植物微丝骨架的共聚焦显微镜观察

植物细胞微丝结构通常是用鬼笔环肽染色或肌动蛋白单克隆抗体染色方法显示。利用共聚焦显微镜可以很好地显示细胞的微丝结构,例如,在组织受伤害时根尖细胞重新极化过程中微丝的排布,烟草悬浮细胞的胞质微丝和细胞核中精细的微丝“篮状”结构,共聚焦显微镜同时被应用于检测肌动蛋白和胞间连丝的共定位等。共聚焦显微镜对于阐明细胞分裂过程中微丝的结构和分布尤其有效。在细胞周期的早前期,周质微丝与早前期微管带处的周质微管平行排列,而在细胞分裂面位置处细胞表面的微丝消失,形成微丝的“缺失带 (depletion zone)”。因此微丝很可能参与了细胞分裂面的位置决定。

由于在固定植物材料的过程中,常会对微丝的结构造成一定程度的破坏或改变,因此发展出了一些进行活体植物细胞中微丝结构的观察方法。活体细胞的观察不仅比较忠实地反映细胞中微丝的结构,而且使我们有可能进一步跟踪微丝结构的变化,对其特性进行动态研究。

微丝的常用染色剂荧光鬼笔环肽的分子量不是很大,虽然在通常情况下很难透过细胞膜,但用低浓度的 DMSO 或 NP-40 等药剂使细胞膜的通透性适度增加,从而使荧光鬼笔环肽可以透过细胞膜进入细胞而使微丝结构染色,改善了微丝骨架的保存,从而在胞内观察到更为清晰的微丝骨架网络,但是细胞膜通透性的增加会干扰细胞的正常生理过程,此外有效标记微丝的鬼笔环肽的浓度也会抑制微丝骨架的动态过程。

近年来常采用的另一方法是:利用显微注射的方法将相对少量的荧光鬼笔环肽引入所选择的细胞,使其微丝结构被染色,然后在共聚焦显微镜下进行观察。在这种方式下,荧光鬼笔环肽可以作为显示微丝动态的探针。一些重要的生理过程,如细胞分裂和胞质环流仍然继续,说明细胞的生理过程并未受到严重的干扰。通过共聚焦显微镜,我们可以对细胞不同焦平面的微丝进行观察,通过这些分析,可以确定和跟踪周质和细胞内部微丝的动态变化。

在植物细胞中微丝和肌球蛋白一起推动着胞质环流。对注射了荧光标记鬼笔环肽的细胞进行共聚焦显微镜观察,结果表明微丝的正确定位和定向对胞质环流非常重要。进一步的证据来自于 profilin (一种

单体肌动蛋白的结合蛋白)和荧光鬼笔环肽对紫露草雄蕊毛的显微注射实验,结果表明当通过显微注射使胞质内 profilin 浓度升高时,胞质环流被抑制。同时,通过共聚焦显微镜观察发现微丝也开始解聚。此外,微丝似乎参与控制细胞质的结构,因为此时跨越液泡的丝消失,而且当注射过量 profilin 导致微丝消失时,细胞核移向细胞一侧。再者,当用低浓度的微丝解聚因子 ADF 与荧光鬼笔环肽通过共注射引入紫露草雄蕊毛细胞,发现随周质微丝排列的改变,细胞的胞质环流方向也发生相应的变化。

最近共聚焦显微镜观察表明微丝在细胞分裂早期的分裂面确立过程中起重要作用,这进一步确认了在固定细胞中得到的结果。在间期细胞中,微丝广泛分布于细胞质中。当细胞进入分裂早期时,一些精细的周质微丝开始出现,并逐渐转为横向排列,尤其在早前期微管带的位置。在细胞核瓦解时或稍微在这之前,早前期微管带处的微管消失。有意思的是,早前期微管带处的微丝也跟着消失。然而,在细胞周质的其他部位微丝仍然存在,这使得微丝在早前期微管带的位置造成一个“缺失带”,这个“缺失带”在以后的有丝分裂和胞质分裂中都存在,这不像早前期微管带是个暂时性的结构。

共聚焦显微镜技术对于花粉管中微丝分布的研究也发挥了重要的作用。花粉管顶端微丝存在与否一直是一个有争论的问题,通过共聚焦显微镜的观察,对这一问题的实质有了进一步的理解。在过去的研究中,有些实验室的结果表明微丝结构伸展到花粉管最顶端,然而另外一些人则认为花粉管顶端没有微丝结构。向百合花粉管中注射荧光标记的鬼笔环肽,然后结合共聚焦显微镜观察表明花粉管顶端没有微丝,但在咖啡因抑制生长以及恢复的过程中,微丝更加靠近顶端。Doris 和 Steer 的结果表明传统的化学固定没法使花粉管处于真实的生活状态,这样,活体标记的技术就显得非常有必要。最近, GFP-talin (踝蛋白)标记微丝的技术表明微丝在花粉管顶端分布其实是一个动态的过程。此外,共聚焦显微镜在对微丝骨架相关蛋白的定位方面也发挥着重要作用,例如肌球蛋白以及其他一些肌动蛋白结合蛋白。利用显微注射的方法把荧光标记的百合肌动蛋白抑制蛋白(profilin)注射进花粉管,共聚焦显微镜观察结果表明 profilin 均匀分布于细胞中,而没有特异定位在质膜上或与微丝束结合。

三、植物细胞骨架的三维图像构建

利用共聚焦显微镜进行观察的优点不仅在于可以取得高质量的观察图像,而且可以通过光切片的方法采集三维分布的信号,并通过计算机的图像处理技术,获得物质或结构在空间上的分布图像。这样的观察对于普通荧光显微镜是难以实现的。通过三维图像的分析,我们可以获得有关细胞功能和机制的非常重要的信息。

在植物间期细胞中,微管通常形成周质微管列阵。周质微管的排列方向与植物细胞的生长有关,通常在快速伸长的细胞中微管是沿伸长轴垂直方向排列,而当生长速率降低或停止时微管会改变排列的方向,沿伸长轴方向斜向或纵向排列。而且各种植物激素或外界刺激都可以引起排列方向的改变。但是植物细胞沿其伸长轴具有四个侧壁和两个端壁。当周质微管发生排列的改变时,在这四个侧壁面上的微管的反应是否相同呢?利用共聚焦显微镜技术,我们就可以对同一细胞的四个侧壁面上的微管结构同时进行观察记录(彩图 26),从而获得这方面的信息。事实上,利用共聚焦显微镜技术已经证明当微管列阵发生排列方向的转变时,通常只是外向的侧面上的微管发生转变,而其他三个面上的微管通常仍维持其垂直于伸长轴的方向。

第二节 植物细胞骨架动态的共聚焦显微镜观察

一、荧光类似物细胞化学法

在细胞生物学的研究中,目前比较强调对活体细胞中动态过程的研究。在这方面共聚焦显微镜有着重要的应用前景。

最近有关共聚焦显微镜在植物细胞研究方面应用的一个进展是,采用显微注射的方法将标记上荧光的细胞骨架蛋白引进植物细胞,然后利用共聚焦显微镜采集其荧光图像,这种特定的方法被叫做“荧光类似物细胞化学法”或者“分子细胞化学法”,即利用显微注射的荧光标记物作为探针来观察与这个探针相联系的结构。例如可以用化学方法将微管蛋白标记上荧光染料,当荧光微管蛋白被注射进细胞时,其进入细胞的微管蛋白库,最后组合到由这个微管蛋白库形成的微管结构中,这样微管结构就被标记上荧光,可以利用共聚焦显微镜进行观察。这一方法的成功应用,使我们在植物细胞骨架的研究方面有了长足的进步。

但在开始时,似乎注定这种方法要失败,因为最初是在普通荧光显微镜下采集图像,这使得采集的图像极不清晰,而且荧光漂白非常迅速,甚至造成细胞死亡。但是共聚焦显微镜的使用使这些问题迎刃而解,图像清晰度增加,荧光漂白降低,对活细胞的光损害也降低。例如对雄蕊毛细胞扫描20次采集一次图像,每个像素点总共才受到50 ms的照射。在共聚焦显微镜使用的条件下,允许研究者在每隔几分钟采集图像,这使得细胞能在几小时内保持活性。相反,一些典型的动物培养细胞则耐受性要差一些,在共聚焦显微镜下荧光的漂白也相对较快,而且容易造成光解(photolyse)。一些研究者发现加入维生素C或者其他的自由基消除剂,能够提高在共聚焦显微镜下动物细胞的存活性。在植物细胞中,能够做一些时间序列观察的实验,例如生长调节剂引起的微管重排和咖啡因处理的一些观察。这些观察在非植物组织中是不容易做到的。

目前研究所采用的标记微管蛋白通常是脑组织(猪脑或牛脑)微管蛋白。实验表明标记的脑微管蛋白能够组合到所有的植物细胞微管列阵中,包括早前期微管带、有丝分裂纺锤体、成膜体以及周质微管列阵。尽管当时担心荧光标记的微管蛋白可能只标记整个微管的一部分,也就是说微管周转较快的部分,但后来对活细胞图像和固定细胞的图像比较的结果表明两者的图像是一致的,这表明注射进细胞的荧光微管蛋白能够标记所有的植物微管。用共聚焦显微镜采集活细胞中的微管图像,使得我们对细胞生长、分裂以及受实验刺激做出反应时微管的结构进行动态追踪成为可能。

例如,利用该方法观察和记录了植物细胞中从细胞后期、晚期到细胞板形成过程中微管的动态变化过程,微管先在纺锤体中带转化形成成膜体微管,然后成膜体微管向细胞周围进行向心生长,并最终完全解体。此外,当受到伤害时或用赤霉素处理后,对植物细胞周质微管列阵的动态变化也用这样的方法进行了实时的记录。这些研究都支持这么一个观点,新的微管列阵或新的排列取向通过动态不稳定性的方式来实现,也就是说旧的微管逐渐解体,新微管在改变的新取向上重新形成(彩图27)。

微管蛋白荧光标记及显微注射结合共聚焦显微镜技术,使得我们追踪微管结构的动态变化对实验条件的反应成为可能。例如,追踪 Ca^{2+} 浓度升高后微管结构的变化研究结果表明,升高 Ca^{2+} 浓度能够改变染色体的运动,这是由于升高 Ca^{2+} 造成微管解聚引起的。在这种情况下,当 Ca^{2+} 浓度升高到1 mmol/L时,造成微管中度解聚(约30%),引起染色体运动速率增加2倍,然而当更高的 Ca^{2+} 浓度造成大量微管解聚时,导致染色体运动减速或者被完全抑制。

二、荧光漂白恢复技术

荧光漂白恢复技术主要是利用强激光将微米大小区域的荧光完全淬灭(光漂白)后,只有通过漂白区和未漂白区荧光分子的相互运动,光漂白区域的荧光才能逐渐恢复,用恢复时间的长短来衡量分子运动速率的快慢。结合共聚焦显微镜的使用,研究者可以对整个细胞(或者细胞核、高尔基体等目标结构)在漂白前和恢复过程中进行高分辨率成像,从而计算分子运动速率。

共聚焦显微镜中荧光漂白恢复(FRAP)技术的应用,使我们测定微管列阵中微管周转(turn over)速率成为可能。结果表明,植物细胞纺锤体微管与动物细胞纺锤体微管周转速率相同,周转半期为30 s。其他微管列阵,包括早前期微管带、成膜体和周质微管列阵的周转半期为60 s,这比纺锤体的周转速率要低,然而却比典型的动物间期微管列阵的周转速率快3~4倍。共聚焦显微镜的观察结果表明植物微管

列阵具有更高的动态特性 (彩图 28)。

第三节 绿色荧光蛋白 (GFP) 与共聚焦显微镜观察

绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 由 238 个氨基酸残基组成, 最早从华盛顿维多利亚水母体内克隆得到。GFP 蛋白本身具有发光功能的荧光基团, 无需特殊的辅因子或其他蛋白的参与。GFP 在组织中表达产生内在的荧光从而可以标记一些正常的细胞学过程, 借助一些高分辨率的光学技术就可以监控这些动态过程。

利用 GFP 标记细胞骨架一般有两种方法: 一是将 GFP 基因与细胞骨架蛋白, 如肌动蛋白或微管蛋白基因, 构建成融合蛋白基因, 当融合蛋白在细胞中表达并组装到细胞骨架中后, 细胞骨架就会带上荧光而被显示出来; 另一种方法是将细胞骨架蛋白的结合蛋白 (如微管结合蛋白 MAP4 和微丝结合蛋白 Talin) 上和细胞骨架蛋白结合的片段与 GFP 构建成融合基因, 当融合蛋白在细胞中表达时, 由于结合片段与细胞骨架结合, 因而使细胞骨架得到荧光标记。

把绿色荧光蛋白和微管蛋白或者微管结合蛋白构建成融合蛋白标记微管骨架技术的发展, 使得直接观察微管动态以及细胞不同时相各微管列阵的动态转换过程成为可能。其很好地显示出了微管的结构, 发现微管有生长的, 也有缩短的, 这符合微管的动力学非稳定性行为。同时, 也观察到了微管在位置上的变化。实验结果也表明在微管取向改变的过程中, 微管的机械转移和微管先解聚, 然后在新的取向上重新聚合这两个过程同时存在。GFP 具有较高的荧光稳定性, 可以对表现为单根微管的长度进行定量分析, 例如对一些细胞的周质微管进行分析, 发现其延长速率约为 $1\text{ }\mu\text{m}/\text{min}$ 。在细胞末期向细胞间期的转换过程中, 有关间期周质微管从何而来有过各种说法, 但一直不是特别确定, 由于 GFP 活体标记微管骨架技术的发展, 使得长时间观察这个转换过程中微管的行为成为可能。结果发现在 M 期向 G_1 期转换的过程中, 微管先在细胞核周围地区重新组织, 然后再在周质的地方组织成周质微管。

在植物细胞微丝骨架的研究中, GFP 技术也得到应用。虽然目前在高等植物中用表达 GFP-actin 的方法还未获得较好的实验结果, 但是利用 actin 的结合蛋白-talin 上结合微丝的片段与 GFP 构建融合基因, 然后转入高等植物细胞获得了很好的效果。GFP-talin 不仅可以在多种植物细胞, 例如表皮细胞、根细胞、保卫细胞、花粉管等中清晰地显示出微丝骨架, 而且 GFP-talin 还被用于微丝骨架动态过程的研究。利用 GFP-talin 表达并结合共聚焦显微镜的观察, 证明了在花粉管尖端存在微细微丝的聚合和解聚的动态过程, 这是用过去的研究技术所难以达到的。

第四节 植物材料共聚焦显微镜观察的制片方法

事实上, 共聚焦显微镜的制片与普通荧光显微镜的制片并无太大的区别。只是在选用染料时要注意所需染料的激发波长应尽量接近共聚焦显微镜激光源的谱线, 以求达到较高的荧光产率。为了使读者能够较方便地应用共聚焦显微镜对植物细胞进行研究, 以下对植物细胞的细胞骨架染色方法做一些介绍。

一、植物材料制片中需注意的问题

间接免疫荧光技术对于研究细胞骨架的结构是最常用的方法。然而, 在应用这个方法之前, 一些有关植物细胞特有的问题必须先加以注意。

一些植物细胞壁的自发荧光会对观察造成影响, 含有叶绿素的叶绿体和细胞质中一些其他的细胞组成成分 (如色素) 也会产生自发荧光。同时, 在一些伤口附近, 例如当使用徒手切片时, 会有酚类物质的释放, 这些物质通常也会产生很强的自发荧光而对观察造成干扰。

在一些大的植物细胞中, 由于液泡占据了大部分的体积, 对固定、切片造成困难。在一些体积较

小,细胞质较为浓厚的分生细胞中遇到分裂象的可能性较大。但如果液泡化细胞的缺点能被克服的话,这类细胞对于研究有丝分裂过程中一些结构的组织非常有利,因为这类细胞在细胞分裂过程中,细胞核会移向细胞的中央,被一些跨液泡的细胞质束悬挂,然后细胞跟着分裂。

植物细胞的细胞壁通常都是细胞固定和染色的主要障碍,如果不对细胞壁进行处理,抗体是无法进入细胞质中的。在一些植物组织中,例如在一些叶片组织中,细胞表面的角质层和蜡质,更是溶液难以逾越的屏障。因此在对植物细胞进行固定之前,通常要对细胞壁进行处理。角质酶(cuticase)可以除去角质,但一般情况下不容易得到。细胞壁的处理一般是用一些商品化的酶(纤维素酶和果胶酶)进行短时间的酶解。酶解细胞壁可以在细胞固定之前或之后进行,而且只需要部分酶解细胞壁,便于抗体进入就行。通常在酶解液中还需加入一定的蛋白,此外对细胞进行物理切片也可以突破细胞壁的障碍酶抑制剂,以防酶液中少量的蛋白酶对细胞骨架造成破坏。固定之后,可以用去污剂充分地破坏细胞膜,同时使细胞质的自发荧光降低。空气干燥或使用一些溶剂也能增加膜的透性,但这两种方法都具有相当强的破坏性,可能会造成一些假象。

植物细胞具有高的渗透势能,因而当细胞壁存在时在细胞内有一定的压力,即所谓的膨压。当细胞壁去除的时候,除非介质中具有和原生质体一样的渗透势,否则水会进入原生质体造成原生质体皱缩造成原生质体涨破。因此,原生质体必须置于等渗的环境中直至固定以后,这通常是通过往溶液中加入甘露醇或山梨醇来实现。尽管通常用的浓度都为0.3 mol/L,但具体到某一种细胞,需要确定一下精确的浓度。通常将原生质体置于渗透剂浓度为0.1~0.8 mol/L的范围内,观察哪一个浓度能够使原生质体保持完整性,而没有额外的收缩或膨胀即可。

因为植物细胞不会自然地贴附在载玻片的表面,因此需要借助于一些介质使植物细胞贴在载玻片或盖玻片表面,以便于在显微镜下观察。大的组织切片相对容易被固定,但是单细胞、悬浮细胞的原生质体或压片细胞相对来说难以固定。空气中干燥使细胞平展,因此会粘得更好些。而且空气中干燥能够通透细胞膜而无需进一步的抽提。这个方法对于细胞质含量高的细胞来说比较不错,但一些大的、液泡化程度高的细胞在这个过程中会变形。最好使这些细胞粘在涂有多聚赖氨酸的载玻片或盖玻片上。如果丙酮处理的载玻片或盖玻片在1 mg/ml的多聚赖氨酸中处理10 min以上,然后用水冲洗,在其上沉降的细胞将被牢固地粘在上面。

最后,固定对于很好地标记植物细胞至关重要,有几种固定剂可供选择。由于溶剂强烈的脱水作用会造成细胞变形,所以最好避免使用。一般情况下,醛类物质是植物研究中最可靠的固定剂;甲醛通常被认为是植物细胞最好的固定剂,甲醛的浓度通常采用4% (w/v),但对于一些组织来说,也可以用8% (w/v)。在一些研究中,通常在甲醛中加入0.1% (v/v)的戊二醛。然而,甚至在游离的醛基被硼氢化钠还原以后,戊二醛也会造成强烈的背景荧光,所以,在使用时要注意。固定时间的长与短则根据样品的大小而定。通常对于单细胞和原生质体来说,15 min左右比较合理,但整个组织块的固定则需要几个小时。

二、植物材料的制片步骤

1. 固定液的配制

甲醛溶液通常用多聚甲醛粉末配制。一般情况下,甲醛溶液可以大量配制,然后冷冻起来。对于一般的工作来说,冷冻的甲醛用于固定就可以了,但为了得到更好的结果,尤其是固定大的组织块时,建议使用新鲜配制的甲醛溶液。

甲醛的配制:

对于浓度为8% (w/v)的甲醛溶液来说,先用水配制成16% (w/v)的溶液。然后往溶液中滴8 mol/L KOH,直至pH高于10.0,溶液通常在通风橱中加热至60℃左右。当溶液完全澄清时,使溶液冷却,往溶液中加入硫酸,使pH值达到6.9(不要用盐酸,否则会产生致癌物质),之后定容到终体积。

然后用 0.45mm 的滤网过滤, 滤去一些颗粒物质。这个溶液用两倍的 MTSB 稀释, 用作新鲜的甲醛或者分装储存在 -20°C 下。

2. 细胞壁酶解液

常用的酶列举如下: ①纤维素酶; ②半纤维素酶; ③果胶酶 Y-23; ④Driselase (淀粉酶)。

注意这些酶应该在通风橱中称量, 因为这些粉末对身体非常有害。此外, 在使用酶液之前, 最好用 300 g 离心 5 min, 取上清作为实验溶液。如果过夜制备原生质体, 需要把混合酶液在 55°C 下处理 5 min, 使蛋白酶变性, 或者是加入一些蛋白酶抑制剂, 或者加入 BSA 增加蛋白酶的作用底物。所有的酶必须保持干燥, 这样能在 4°C 下保存数月。为了长久使用, 母液必须在 -20°C 下冷冻保存。

3. 缓冲液和溶液

(1) 微管稳定缓冲液 (Microtubule stabilizing buffer, MTSB) MTSB 由 50 mmol/L PIPES ($\text{pH} 6.9$)、5 mmol/L MgSO_4 、5 mmol/L EGTA 组成。在配 MTSB 之前, 最好配制 1 mmol/L PIPES, 1 mmol/L MgSO_4 和 200 mmol/L EGTA 的母液。这些母液以及 MTSB 能在 4°C 保存几个月。这些母液应该用 KOH 将 pH 值调至 6.9。要求 PIPES 是自由酸的形式, 而不是二钠盐的形式。EGTA 母液储存于塑料瓶中, 而不应该储存于玻璃瓶中, 因为浓的 EGTA 会腐蚀玻璃。对于 200 ml 的 1 mmol/L PIPES 母液来说, 大约需要加 20 g 固体 KOH 才能使 PIPES 溶解。

(2) 多聚赖氨酸 分子量大于 250 000 (Sigma), 溶于水中, 工作浓度为 1 mg/ml, 储存分装母液 (5 mg/ml) 于 -20°C 下。

(3) DAPI (4,6-diamidine-2-phenylindole dihydrochloride) 用于细胞核的染色。溶于水中, 母液浓度为 0.5 mg/ml, 室温黑暗储存。注意这是一个致癌物质。

(4) 荧光标记的鬼笔环肽 有各种荧光物质标记的鬼笔环肽, 例如 Alexa-488、Alexa-546、Rhodamine 和 FITC 标记。母液一般用甲醇配制, 使用之前用 0.5 mol/L PIPES 溶液稀释。工作浓度为 50 nmol/L~1 mmol/L。注意此药有毒性。

(5) Mes 冲洗液 0.5% (w/v) Mes ($\text{pH} 5.8$)、80 mmol/L CaCl_2 、0.3 mmol/L 甘露醇, 这都可以大量准备, 灭菌后分装储存于室温下。

4. 染色方法

(1) 分生组织的微管结构 根尖细胞中的细胞骨架 根尖可能是最容易标记微管的材料。下面是标记根尖细胞微管的方法, 最先由 Wick 等人描述过 (1981)。在描述的原方法中, 磷酸缓冲液对根尖细胞来说是最适合的。但磷酸缓冲液会使根毛细胞等其他细胞中的微管断裂, 考虑到这个因素, 采用 PIPES 缓冲液取代磷酸缓冲液。

染色的具体步骤如下:

①萌发一定数量的洋葱、小麦等种子于湿的滤纸上, 置于一个密封的塑料盒子中。暗室, 25°C 下约 4 d 左右。

②剪取 2~3 mm 的根尖, 置于 1 ml 4% 甲醛 (溶于 MTSB) 中, 室温固定 45 min。一些大的根尖, 例如豌豆的根尖, 应该纵向切开以利于固定剂及下个步骤酶液的进入。冲洗组织至少 3 次, 合计时间超过 45 min。

③2% (w/v) 纤维素酶 ("Onozuka" R-10, 溶于 MTSB 中) 酶解 6 min。

④MTSB 冲洗组织以洗去多余的酶液, 至少 3 次, 合计时间超过 45 min。

⑤用一个小的棒状物, 例如铅笔头, 轻轻地压准备好的根尖。只需要少量的缓冲液以防止根尖立刻粘在载玻片上或四处移动。压一次就足够分开根尖, 用镊子去掉四处移动的根尖和大的碎片, 让分离的细胞在空气中干燥 (至少 15 min)。

⑥加入稀释到适当倍数的一抗溶液 (于 3% BSA/MTSB 中)。将载玻片置于湿的塑料容器中 (保持湿度), 室温下 1 h。

⑦小心冲洗载玻片以除去多余和非特异吸附的一抗,至少3次,每次5min。注意:一些结合不牢的细胞在剧烈冲洗中可能会丢掉。

⑧二抗孵育。加入稀释到适当倍数的二抗(3%BSA/MTSB),其孵育方式同一抗,1h。要注意避光,以防荧光物质被漂白。

⑨用MTSB冲洗3~4次,最后用DAPI染色(如果需要的话),DAPI工作浓度为1mg/ml,染色时间为1min,然后MTSB冲洗一次。将缓冲液尽可能去除干净,加入抗荧光漂白的封片剂,加上盖玻片,轻轻地压盖玻片以除去多余的封片剂,然后盖玻片周围用指甲油封固。

(2) 悬浮培养细胞的微管结构 植物悬浮培养细胞的一个好处就是能够提供大量比较规则的细胞。下面一些植物悬浮培养细胞经常用于细胞骨架染色,包括胡萝卜悬浮培养细胞、玉米悬浮培养细胞和烟草BY-2悬浮培养细胞等。

在悬浮细胞的染色过程中的每一个阶段都要注意避免细胞发生干燥,在换溶液时要轻轻操作,以免冲走悬浮细胞。在悬浮细胞的染色过程中需要保持细胞的形状,因此细胞必须先固定以保证细胞骨架在整个细胞中的分布不发生改变。但是,如果先固定的话,又不能对细胞很好地进行免疫标记,因为抗体不能进入固定的细胞壁。因此,在固定之前需将细胞轻微酶解(约10min)。

具体步骤如下:

A. 先固定后酶解的步骤:

①取25ml培养细胞自然沉降或150g离心5min收集细胞。用8%(w/v)甲醛(于Mes冲洗液中)置换培养液。倒置离心管加以混合,然后自然沉降45min。

②吸去固定液,加入25ml Mes冲洗液,倒置离心管。50g,5min离心沉降细胞,吸去溶液,重复两次以上。

③准备10ml混合酶液。混合酶液置换冲洗缓冲液,酶解1~3h,轻轻摇晃。

④150g离心5min,轻轻吸去酶液,加入20ml Mes,倒置,再次离心,弃去上清。

⑤重新悬浮细胞于5ml的Mes冲洗液中,加数滴细胞于涂有多聚赖氨酸的载玻片上。放置10min,然后用吸管吸去多余的细胞。

⑥1% Triton X-100/MTSB抽提10min。

⑦MTSB冲洗5次,注意别让细胞冲走。

⑧免疫标记的方法同根尖细胞的染色步骤。

B. 先轻微酶解,后固定的步骤:

①准备10ml混合酶液。

②取25ml培养细胞,自然沉降或150g离心5min。酶液置换培养液,于25℃摇床上孵育10~15min。酶解的时间可以视情况而定,但酶解不能过长,否则很多细胞会完全变成原生质体。

③在显微镜下检测细胞,保证大部分细胞的完整性,以下的步骤按照以上A方法的步骤④开始往下进行。

(3) 微丝的染色 微丝的荧光标记常采用荧光鬼笔环肽和免疫荧光两种方法。

荧光鬼笔环肽的染色方法较为简便。组织或细胞固定后,用一定浓度的荧光鬼笔环肽染色,封片后即可进行观察。染色所需浓度视实验材料和染料而定。对于某些植物材料,也可以不经固定而用DMSO等使细胞膜适度通透,使荧光鬼笔环肽能够进入细胞进行微丝的染色,达到活体细胞染色的效果。荧光鬼笔环肽染色的方法可以很好地标记微丝结构,在共聚焦显微镜观察下可以获得非常清晰的微丝图像,因此被广泛地采用。但是荧光鬼笔环肽在某些细胞中可能不能很好地与微丝结合,因而造成染色效果较差,特别是某些微丝抑制剂(如松胞素D)可能干扰荧光鬼笔环肽与微丝的结合,造成染色的假象。因此免疫荧光的染色可能更为可靠。在荧光鬼笔环肽不染上色的情况下,可以考虑用免疫荧光的染色方法。

微丝的免疫荧光染色步骤与上述的微管的染色步骤是基本相同的,所不同处仅在于一抗为抗肌动蛋

白的抗体,在此不再赘述。

总之,共聚焦显微镜技术在细胞生物学的研究中已经得到了非常广泛的应用,其发展对细胞生物学的研究起到了重大的推动作用。本文所述及的内容仅仅是其应用领域的很小的一部分,其他如细胞钙信号的测定、pH 梯度的测定、DNA 和 RNA 的测定等都应用了共聚焦显微镜技术。可以毫不夸张地说,凡是涉及荧光测定的方法几乎都可以考虑应用共聚焦显微镜技术。此外,随着共聚焦显微镜技术的进一步发展,如双光子和多光子共聚焦显微镜的出现,会有更多的新方法和新技术产生,从而使我们在细胞生物学的研究中具有更多的强有力的研究手段。

附录一 细胞生物学名词解释

1. **分辨率 (resolution)** 分辨率是指能分辨出的相邻两个物点间最小距离的能力, 这种距离称为分辨距离。分辨距离越小, 分辨率越高。一般规定: 显微镜或人眼在 25 cm 明视距离处, 能清楚地分辨被检物体细微结构最小间隔的能力, 称为分辨率。人眼的分辨率是 100 μm ; 光学显微镜的最大分辨率是 0.2 μm 。

2. **荧光** 物质经过紫外线照射后发出荧光的现象可分为两种情况: 第一种是自发荧光, 如叶绿素、血红素等经紫外线照射后, 能发出红色的荧光, 称为自发荧光; 第二种是诱发荧光, 即物体经荧光染料染色后再通过紫外线照射而发出荧光, 称为诱发荧光。

3. **荧光显微镜 (fluorescence microscope)** 以紫外线为光源, 用以照射被检物体, 使之发出荧光, 然后在显微镜下观察物体的形状及其所在的位置。此法用于研究细胞内物质的吸收、运输和化学物质的分布及定位等。

4. **相差显微镜 (phase contrast microscope)** 相差显微镜是荷兰科学家 Zernike 于 1935 年发明的, 用于观察未染色标本的显微镜。活细胞和未染色的生物标本, 因细胞各部细微结构的折射率和厚度的不同, 光波通过时, 波长和振幅并不发生变化, 仅相位发生变化 (振幅差), 这种振幅差人眼无法观察。而相差显微镜通过改变这种相位差, 并利用光的衍射和干涉现象, 把相差变为振幅差来观察活细胞和未染色的标本。相差显微镜和普通显微镜的区别是: 用环状光阑代替可变光阑, 用带相板的物镜代替普通物镜, 并带有一个合轴用的望远镜。

相差显微镜具有两个其他显微镜所不具有的功能: ①将直射的光 (视野中背景光) 与经物体衍射的光分开; ②将大约一半的波长从相位中除去, 使之不能发生相互作用, 从而引起强度的变化。

5. **放射自显影 (autoradiography)** 放射自显影的原理是利用放射性核素所发射出来的带电离子 (α 或 β 粒子) 作用于感光材料的卤化银晶体, 从而产生潜影, 这种潜影可用显影液显示, 成为可见的“像”。因此, 它是利用卤化银乳胶显像检查和测量放射性的一种方法。

放射性核素的原子不断衰变, 当衰变掉一半时所需要的时间称为半衰期。各种放射性核素的半衰期长短不同 (附表), 在自显影实验中多选用半衰期较长者。对于半衰期较短的核素, 应选用较快的样品制备方法, 所用剂量也应加大。

6. **扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM)** 扫描电子显微镜是 1965 年发明的较现代的细胞生物学研究工具, 主要是利用二次电子信号成像来观察样品的表面形态, 即用极狭窄的电子束去扫描样品, 通过电子束与样品的相互作用产生各种效应, 其中主要是样品的二次电子发射。二次电子能够产生样品表面放大的形貌像, 这个像是在样品被扫描时按时序建立起来的, 即使用逐点成像的方法获得放大像。

7. **扫描透射电子显微镜 (scanning transmission electron microscope, STEM)** 是一种既有透射电子显微镜功能又有扫描电子显微镜功能的显微镜, 像 SEM 一样, STEM 用电子束在样品的表面扫描, 又像 TEM 一样, 通过电子穿透样品成像。STEM 能够获得 TEM 所不能获得的一些关于样品的特殊信息。STEM 技术要求较高, 要非常高的真空度, 并且电子学系统比 TEM 和 SEM 都要复杂。

8. **高压电子显微镜 (high-voltage electron microscope, HVEM)** 同透射电子显微镜基本相同, 只是电压特别高。TEM 使用的加速电压是 50~100 kV, 而 HVEM 使用的电压是 200~1 000 kV。由于电压高, 就会大大减少造成染色体畸变的可能, 因此, 可以用较厚的细胞切片研究细胞的结构, 切片的厚度最大可达 1 μm , 相当于普通 TEM 样品厚度的 10 倍。

附表 放射性核素半衰期、粒子类型和能量

名称	半衰期	粒子类型	能量 (MeV)
^3H	12.3 a	β	0.018
^{14}C	20 min	β	0.981
^{14}C	5 700 a	β	0.155
^{32}P	14.3 d	β	1.71
^{35}S	87.2 d	β	0.167
^{131}I	8.0 d	β	0.25
^{45}Ca	152 d	β	0.26
^{59}Fe	45 d	β	0.46
		γ	1.30
		β	0.308
^{60}Co	5.3 a	β	0.657
^{64}Cu	12.8 h	γ	1.35

9. 负染色 (negative staining) 用重金属盐 (如磷钨酸钠、醋酸铀等) 对铺展在载网上的样品进行染色, 使整个载网都铺上一层重金属盐, 而有凸出颗粒的地方则没有染料沉积。由于电子密度高的重金属盐包埋了样品中低电子密度的背景, 增强了背景散射电子的能力以提高反差, 这样, 在图像中背景是黑暗的, 而未被包埋的样品颗粒则透明光亮, 这种染色称为负染技术。负染色是只染背景而不染样品, 与光学显微镜样品的染色正好相反。

10. 铸型技术 (shadow casting) 铸型技术是电子显微镜中一种重要的增强样品表面机构反差的方法。表面铸型基本过程包括: ①将样品置于云母的表面, 然后干燥; ②在真空装置中将样品镀上一层重金属 (金或铂金), 喷镀时的加热丝具有一定的角度; ③将样品镀上一层碳原子, 以增加铸型的强度和稳定性; ④将铸型置于酸池中, 破坏样品, 只留下金属铸型; ⑤将铸型漂洗后置于载网上进行电子显微镜观察。

生物样品管腔铸型基本过程: ①准备铸型灌注液; ②生物样品取材固定, 冲洗管腔; ③用铸型灌注液灌注样品; ④使铸型灌注液固化; ⑤将铸型样品置于酸池中, 破坏生物样品, 只留下铸型剂; ⑥铸型清洗、干燥; ⑦将铸型放入离子溅射仪进行喷金导电处理; ⑧扫描电子显微镜观察铸型结构。

11. 冰冻断裂复型 (freeze-fracture replication) 技术 先将生物样品在液氮中 (-196°C) 进行快速冷冻, 防止形成冰晶。然后将冷冻的样品迅速转移到冷冻装置中, 并迅速抽成真空。在真空条件下, 用冰刀横切冰冻样品, 使样品内层被分开露出两个表面。如用冰刀切开细胞膜时, 分开的两个面分别称为 P 面 (protoplasmic face) 和 E 面 (exoplasmic face), P 面是靠近细胞质一面的半层膜, 而 E 面则是靠近细胞外基质面的半层膜, 可清楚地观察到镶嵌蛋白。

12. 冰冻蚀刻 (freeze-etching) 技术 是在冰冻断裂技术的基础上发展起来的更复杂的复型技术。如果将冰冻断裂样品的温度稍微升高, 让样品中的冰在真空中升华, 可以在表面上浮雕出细胞膜的超微结构。当大量的冰升华之后, 对浮雕表面进行铂-碳复型, 并在腐蚀性溶液中除去生物材料, 复型经重蒸水多次清洗后, 置于载网上进行电镜观察。

13. 扫描隧道显微镜 (scanning tunneling microscope, STM) 扫描隧道显微镜使用电子学的方法, 用一个金属针尖在样品表面扫描。当针尖和样品表面距离很近时 (1nm 以下), 针尖和样品表面之间会产生电压。当针尖沿 X 和 Y 方向在样品表面扫描时, 就会在针尖和样品表面第一层电子之间产生电子隧道。该显微镜采用沿 Z 字形扫描, 可保持电流的恒定。因此, 针尖的移动是隧道电流的作用, 并且可以反映在荧光幕上。连续的扫描可以建立起原子级分辨率的表而像。

与电子显微镜或 X 线衍射技术研究生物结构相比, 扫描隧道显微镜具有以下特点: ①高分辨率, 扫描隧道显微镜具有原子级的空间分辨率, 其横向空间分辨率为 0.1nm, 纵向分辨率达 0.1nm; ②扫描隧道

显微镜可直接探测样品的表面结构,绘出立体三维结构图像;③扫描隧道显微镜可在真空、常压、空气、甚至溶液中探测物质的结构,而且由于没有高能电子束,对表面结构没有破坏作用(如辐射、热损伤等),所以能对生理状态下生物大分子和活细胞膜表面的结构进行研究,样品不会受到损伤而保持完好;④扫描隧道显微镜的扫描速度快,获取数据的时间短,成像也快,有开展生命过程的动力学研究可能性;⑤不需任何透镜、体积小,有人称之为“口袋显微镜(pocket microscope)”。

14. 酶细胞化学技术(enzyme cytochemistry) 将细胞内的酶与底物相互作用,再将酶反应的产物作为反应物质,在酶的作用部位进行捕捉,使其在显微镜下定位。这种在酶作用下产生反应产物,经捕捉反应来间接证明酶定位的反应称为酶的细胞化学反应。

酶的细胞化学反应包括两个反应:第一反应是酶作用于底物的反应,称酶反应,形成的产物称为初级反应产物;第二反应是捕捉剂与初级反应产物的作用,称捕捉反应,产生最终反应产物。

15. 免疫荧光技术(immunofluorescence) 将免疫学方法(抗原抗体特异结合)与荧光标记技术结合起来研究特异蛋白抗原在细胞内分布的方法。由于荧光素所发生的荧光可在荧光显微镜下检出,从而可对抗原进行细胞定位。

16. 免疫电镜技术(immunoelectron microscopy) 将抗体进行特殊标记后用电子显微镜观察免疫反应的结果,根据标记方法的不同,分为免疫铁蛋白技术、免疫酶标技术和免疫胶体金技术。如免疫铁蛋白技术是将含铁蛋白通过一种低分子量的双功能试剂与抗体结合,形成一种双分子复合物,它既保留抗体的免疫活性,又具有电镜下可见的高电子密度铁离子核心,因此用铁蛋白标记的抗体可通过电镜免疫化学的方法在电镜下定位细胞中的抗原。由于某些固定技术(如锇酸固定)对抗体抗原的结合有干扰,因此应采取较为温和的样品制备方法。

17. 染色体分选(chromosome sorting) 用流式细胞计分选特定的染色体,基本过程与细胞分选相似。不同的是,要用带有荧光标记的DNA探针同特异染色体结合,使待分选的染色体带上标记。在染色体分选中,使用的探针是同所感兴趣染色体互补的寡聚核苷酸,这种探针也可同荧光染料耦联。将结合有荧光染料的探针同染色体一起温育,使探针同特异染色体杂交,形成稳定的杂交体,这样染色体就被带上了荧光标记,稀释后送入流式细胞计的流室,然后与细胞分选过程一样将特异的染色体分选出来。

18. 显微分光光度术(microspectrophotometry) 将显微镜技术与分光光度计结合起来的的技术。它以物质分子的光吸收、荧光发射和光反射特性作为测定基础,可用来分析生物样品细微结构中的化学成分,同时进行定位、定性和定量。

19. 显微荧光光度术(microfluorometry) 利用显微分光光度计对细胞内原有能发光的物质或对细胞内各种化学成分,用不同的荧光经荧光探针标记后进行定位、定性和定量的测定,称为显微荧光光度术,也称细胞荧光光度术(cytofluorometry)。它是一种微观而灵敏的方法,对于研究细胞的结构、功能及其变化具有重要意义。

20. 磁共振技术(nuclear magnetic resonance, NMR) 磁共振技术可以直接研究溶液和活细胞中小分子量(20 000 Da 以下)蛋白质、核酸以及其他分子的结构,而不损伤细胞。磁共振的基本原理是:原子核有自旋运动,在恒定的磁场中,自旋的原子核将绕外加磁场作回转动,叫进动(precession)。进动有一定的频率,它与所加磁场的强度成正比。如在此基础上再加一个固定频率的电磁波,并调节外加磁场的强度,使进动频率与电磁波频率相同,这时原子核进动与电磁波产生共振,叫磁共振。磁共振时,原子核吸收电磁波的能量,记录下的吸收曲线就是磁共振谱(NMR-spectrum)。由于不同分子中原子核的化学环境不同,将会有不同的共振频率,产生不同的共振谱。记录这种波谱即可判断该原子在分子中所处的位置及相对数目,用以进行定量分析及分子量的测定,并对有机化合物进行结构分析。

21. 细胞工程技术(cell engineering) 细胞工程技术是细胞生物学与遗传学的交叉领域,主要利用细胞生物学的原理和方法,结合工程学的技术手段,按照人们预先的设计,有计划地改变或创造细胞遗传性的技术。包括体外大量培养和繁殖细胞,或获得细胞产品,或利用细胞体本身,主要内容有:细

胞融合、细胞生物反应器、染色体转移、细胞器移植、基因转移、细胞及组织培养。

22. 原代培养 (primary culture) 原代培养是指直接从机体取下细胞、组织和器官后立即进行培养。因此,较为严格地说是指成功传代之前的培养,此时的细胞保持原有细胞的基本性质,如果是正常细胞,仍然保留二倍体数。但实际上,通常把第一代至第十代以内的培养细胞统称为原代细胞培养。最常用的原代培养有组织块培养和分散细胞培养。组织块培养是将剪碎的组织块直接移植在培养瓶壁上,加入培养基后进行培养;分散培养则是将组织块用机械法或化学法使细胞分散。如欲从胎儿或新生儿的组织分离到活性最好的游离细胞,经典的方法是用蛋白水解酶(如胰蛋白酶和胶原酶)消化细胞间的结合物或用金属离子螯合剂(如EDTA)除去细胞互相粘着所依赖的 Ca^{2+} ,再经轻度机械振荡,使之成为单细胞。

23. 愈伤组织 (callus, calli) 植物受创伤后,在伤面新生的组织称为愈伤组织。其原因是由于受创伤刺激后,伤面附近的活组织恢复了分裂功能,加速增生而将伤面愈合。在植物组织培养中的愈伤组织是指植物细胞在组织培养过程中形成的无一定结构的组织团块,在适宜的条件下,愈伤组织可再分化,形成芽、根,再生成植株。

24. 细胞融合 (cell fusion) 在自发或人工诱导下,两个不同基因型的细胞或原生质体融合形成一个杂种细胞。基本过程包括细胞融合形成异核体(heterokaryon),异核体通过细胞有丝分裂进行核融合,最终形成单核的杂种细胞。有性繁殖时发生的精卵结合是正常的细胞融合,即由两个配子融合形成一个新的二倍体。

自发的动物细胞融合几率很低,1962年Okada和Tadokoro发现灭活的仙台病毒有促进细胞融合的作用,这是由于病毒的磷脂外衣与动物细胞的膜十分相似的缘故。病毒外壳上的某些糖蛋白可能还有促进细胞融合的功能。此外,用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)作为细胞融合剂,它可引起邻近的细胞膜的粘合,继而使细胞融合成为一个细胞。

25. 单克隆抗体技术 (monoclonal antibody technique) 1975年由英国科学家Milstein和Kohler发明,并获得1984年诺贝尔医学奖。它是将产生抗体的单个B淋巴细胞同肿瘤细胞杂交,获得既能产生抗体,又能无限增殖的杂种细胞,并以此生产抗体的技术。其原理是:B淋巴细胞能够产生抗体,但在体外不能进行无限分裂,而瘤细胞虽然可以在体外进行无限传代,但不能产生抗体,将这两种细胞融合后得到的杂交瘤细胞具有两种亲本细胞的特性。

26. 显微操作术 (micromanipulation) 在显微镜下,用显微操作装置对细胞进行解剖手术和微量注射的技术称显微操作技术。显微操作仪是在显微镜下对细胞进行显微操作的装置,可用于细胞核移植、基因注入、染色体微切和胚胎切割等手术。

27. 差速离心 (differential centrifugation) 主要是采取逐渐提高离心速度的方法分离出不同大小的细胞器。起始的离心速度较低,让较大的颗粒沉降到管底,小的颗粒仍然悬浮在上清液中。收集沉淀,改用较高的离心速度离心悬浮液,将较小的颗粒沉降,以此类推,达到分离不同大小颗粒的目的。

28. 移动区带离心 (moving-zone centrifugation) 这一方法需要用蔗糖或甘油制备轻微连续密度,然后将待分离的样品加在离心管的最上层,形成一狭窄的带,再通过较长时间的离心。在离心过程中,大小、形状、密度不同的颗粒就会分开,最后收集各区带得到要分离的物质。在此方法中,分离介质对被分离的物质必须是中性无害的,并且密度梯度要较低,底部的密度比管顶部的密度大,建立密度梯度的目的是防止扩散。重要的是,待分离颗粒的密度比离心管中任何部分介质的密度都要大。常用的是蔗糖密度梯度离心(sucrose density gradient centrifugation)。

29. 等密度离心 (isodensity centrifugation) 等密度离心分离样品主要是根据被分离样品的密度进行离心。在这种离心分离方法中,要用介质产生一种密度梯度,这种密度梯度覆盖了待分离物质的密度,这样,通过离心使不同密度的颗粒悬浮到相应的介质密度区。在这种梯度离心中,颗粒的密度是影响最终位置的唯一因素,因此用这种方法分离颗粒,主要是利用被分离颗粒的密度差异完成。只要被分离颗粒间的密度差异大于1%就可用此法分离。

蔗糖或者甘油(它们的最大密度是 1.3 g/cm^3)通常可用于分离膜结合的细胞器,如高尔基体、内质

网、溶酶体和线粒体。在等密度梯度离心中蔗糖或甘油梯度的作用与移动区带离心中梯度的原理是不同的,在移动区带离心中梯度的唯一目的是减少样品的扩散,即使是在离心管的底部,颗粒的密度也比介质大。相反,在等密度梯度离心中,使用的密度是足以阻止颗粒移动的密度,当颗粒达到与本身密度相同的密度区时就会停留在该区域。

离心分离密度大于 1.3 g/cm^3 的样品,如 DNA、RNA,需要使用密度比蔗糖和甘油大的介质。重金属盐氯化铯 (CsCl) 是目前使用的最好的离心介质,它在离心场中可自行调节形成浓度梯度,并能保持稳定。在氯化铯形成的密度梯度中,离心管顶部的密度为 1.65 g/cm^3 ,底部为 1.75 g/cm^3 。因为 DNA 的密度是 1.70 g/cm^3 ,因此会停留在离心管的中部。

30. 层析分离技术(chromatography) 根据蛋白质的形态、大小和电荷的不同而设计的物理分离方法。各种不同的层析方法都涉及到共同基本特点:有一个固定相和流动相,当蛋白质混合溶液(流动相)通过装有珠状或基质材料的管或柱(固定相)时,由于混合物中各组分在物理化学性质(如吸引力、溶解度、分子的形状与大小、分子的电荷性与亲和力)等方面的差异,使各组分在两相间进行反复多次的分配而得以分开。流动相的流动取决于引力和压力,而不需要电流。用层析法可以纯化得到非变性的、天然状态的蛋白质。层析的方法很多,其中凝胶过滤层析、离子交换层析、亲和层析等是目前最常用的层析方法。

31. 凝胶过滤层析 (gel filtration chromatography) 凝胶过滤层析法又称排阻层析或分子筛方法,主要是根据蛋白质的大小和形状,即蛋白质的质量进行分离和纯化。层析柱中的填料是某些惰性的多孔网状结构物质,多是交联的聚糖(如葡聚糖或琼脂糖)类物质,可使蛋白质混合物中的物质按分子大小的不同进行分离。

32. 亲和层析 (affinity chromatography) 将具有特殊结构的亲和分子制成固相吸附剂放置在层析柱中,当要被分离的蛋白混合液通过层析柱时,与吸附剂具有亲和能力的蛋白质就会被吸附而滞留在层析柱中。那些没有亲和力的蛋白质由于不被吸附,直接流出,从而与被分离的蛋白质分开,然后选用适当的洗脱液,改变结合条件将被结合的蛋白质洗脱下来,这种分离纯化蛋白质的方法称为亲和层析。

在生物分子中有些分子的特定结构部位能够同其他分子相互识别并结合,如酶与底物的识别结合、受体与配体的识别结合、抗体与抗原的识别结合,这种结合既是特异的,又是可逆的,改变条件可以使这种结合解除,生物分子间的这种结合能力称为亲和力。亲和层析就是根据这种原理设计的蛋白质分离纯化方法。

33. 基因工程技术 (gene engineering) 基因工程是以分子遗传学为理论基础,以分子生物学和微生物学的现代方法为手段,将不同来源的基因 (DNA 分子) 按预先设计的蓝图,在体外构建杂种 DNA 分子,然后导入活细胞,以改变生物原有的遗传特性,获得新品种、生产新产品。基因工程技术为基因的结构和功能的研究提供了有力的手段。

34. 基因克隆 (gene cloning) 是 20 世纪 70 年代发展起来的一项具有革命性的研究技术,可概括为:分、切、连、转、选。“分”是指分离制备合格的待操作的 DNA,包括作为运载体的 DNA 和欲克隆的目的 DNA;“切”是指用序列特异的限制性内切酶切开载体 DNA 或者切出目的基因;“连”是指用 DNA 连接酶将目的 DNA 同载体 DNA 连接起来,形成重组的 DNA 分子;“转”是指通过特殊的方法将重组的 DNA 分子送入宿主细胞中进行复制和扩增;“选”则是从宿主群体中挑选出携带有重组 DNA 分子的个体。基因工程技术的两个最基本的特点是分子水平上的操作和细胞水平上的表达。而分子水平上的操作是体外重组的过程,实际上是利用工具酶对 DNA 分子进行“外科手术”。

35. 基因敲除 (gene knockout) 是指一个有功能的基因通过基因工程方法完全被剔除的人工突变技术。人为地将小鼠的某一种有功能的基因完全缺失的技术就称为基因敲除技术。这项技术是 Mario Capecchi 于 20 世纪 80 年代末在 Utah 大学发展起来的。实验的动物通常是小鼠,被敲除了功能基因的小鼠就称为敲除小鼠 (knockout mice)。基因敲除技术已成功地应用于几种遗传病的研究,还可用于研究特定基因的细胞生物学活性以及研究发育调控的基因作用等,因此是研究基因功能的一项非常有用的技术。基因敲除是一套组合技术,包括基因重组、细胞分离培养、转基因等。

附录二 免疫细胞化学常用试剂及其配制方法

第一节 固定剂

大多数神经激素、肽类物质为水溶性，在用于免疫细胞化学研究之前，常需固定。但肽类和蛋白质的物理、化学性质不同，因而对不同的固定方法及固定剂的反应也不尽相同。某些固定剂甚至可同时破坏和（或）保护同一抗原的不同抗原决定簇。因此，在进行免疫细胞化学研究之前，很有必要了解所要研究物质（蛋白质或肽类）的化学性质，并根据需要来选择适宜的固定剂（或固定方法）以及改进固定条件。

目前，免疫细胞化学研究中常用的固定剂仍为醛类固定剂，其中以甲醛类和戊二醛最为常用。以下简要介绍几种目前较为常用的固定剂，可根据需要选用。

一、4%多聚甲醛-0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH7.3)

1. 试剂 ①多聚甲醛 40 g，②0.1 mol/L 磷酸缓冲液至 1 000 ml。

2. 配制方法 称取 40g 多聚甲醛，置于三角烧瓶中，加入 500~800 ml 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (phosphate buffer 以下简称 PB)，加热至 60℃左右，持续搅拌（或磁力搅拌）使粉末完全溶解，通常需滴加少许 1 mol/L NaOH 才能使溶液清亮，最后补足 0.1 mol/L 的 PB 于 1 000 ml，充分混匀。

3. 应用 该固定剂较适于光镜免疫细胞化学研究，最好是动物经灌注固定取材后，继续浸泡固定 2~24 h。另外，该固定剂较为温和，适于组织标本的较长期保存。

二、4%多聚甲醛-磷酸二氢钠/氢氧化钠

1. 试剂 A 液：多聚甲醛 40 g、蒸馏水 400 ml，B 液： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 16.88 g、蒸馏水 300 ml，C 液：NaOH 3.86 g、蒸馏水 200 ml。

2. 配制方法 A 液最好在 500 ml 的三角烧瓶中配制（方法同前），至多聚甲醛完全溶解后冷却待用。注意，在溶解多聚甲醛时，要尽量避免吸入气体或使液体溅入眼内。B 液和 C 液配制好后，将 B 液倒入 C 液中，混合后再加入 A 液，以 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 将 pH 调至 7.2~7.4。最后，补充蒸馏水至 1 000 ml 充分混合，4℃冰箱保存备用。

3. 应用 该固定剂适于光镜和电镜免疫细胞化学研究，用于免疫电镜时，最好加入少量新鲜配制的戊二醛，使其终浓度为 0.5%~1%。该固定剂较温和，适于组织的长期保存。组织标本放于该固定液中，4℃冰箱保存数月仍可获得满意的染色效果。

三、Bouin 液及改良 Bouin 液

1. 试剂 ①饱和苦味酸 700 ml，②40%甲醛 250 ml，③冰醋酸 50 ml。

2. 配制方法 先将饱和苦味酸过滤，加入甲醛（有沉淀者禁用），最后加入冰醋酸，混合后存于 4℃冰箱中备用。冰醋酸最好在用前加入。改良 Bouin 液不加冰醋酸。

3. 应用 该固定液为组织学、病理学常用固定剂之一，对组织的穿透力较强，固定较好，结构完整。但因偏酸性（pH 为 3~3.5），对抗原有一定损害，且组织收缩较明显，故不适于组织标本的长期保

存。此外,操作时,应避免吸入气体或与皮肤接触。

四、Zamboni (stefanini) 液

1. 试剂 ①多聚甲醛 20 ml, ②饱和苦味酸 150 ml, ③Karasson-Schwlt PB 至 1 000 ml。

2. 配制方法 称取多聚甲醛 20 g, 加入饱和苦味酸 150 ml, 加热至 60℃左右, 持续搅拌使充分溶解、过滤及冷却后, 加 Karasson-Schwlt PB 至 1 000 ml 充分混合 (Karasson-Schwlt 磷酸缓冲液的配制方法见后)。

3. 应用 该固定液适于电镜免疫细胞化学, 对超微结构的保存较纯甲醛优, 也适于光镜免疫细胞化学研究, 为实验室常用固定剂之一。我们在应用中, 常采用 2.5% 的多聚甲醛和 30% 的饱和苦味酸, 以增加其对组织的穿透力和固定效果而保存更多的组织抗原, 固定时间为 6~18 h。

五、PLP 液 (periodate-lysine-paraformaldehyde fixative 过碘酸盐-赖氨酸-多聚甲醛固定液,)

1. 试剂 过碘酸钠、赖氨酸盐酸盐 (或盐酸赖氨酸)、多聚甲醛、蒸馏水。

2. 配制方法

(1) 贮存液 A (0.1 mol/L 赖氨酸-0.5 mol/L Na_3PO_4 , pH7.4) 称取赖氨酸盐酸盐 1.827 g 溶于 50 ml 蒸馏水中, 得到 0.2 mol/L 的赖氨酸盐酸盐溶液, 然后加入 Na_2HPO_4 至 0.1 mol/L, 将 pH 调至 7.4, 补足 0.1 mol/L 的 PB 至 100 ml, 使赖氨酸浓度也为 0.1 mol/L, 4℃冰箱保存, 最好两周内使用。此溶液的渗透浓度为 300 mmol/L。

(2) 贮存液 B (8%多聚甲醛溶液) 称 8 g 多聚甲醛加入 100 ml 蒸馏水中, 配成 8%多聚甲醛液 (方法见前)。过滤后 4℃冰箱保存。

(3) 临用前, 以 3 份 A 液与 1 份 B 液混合, 再加入结晶过碘酸钠 (NaIO_4), 使 NaIO_4 终浓度为 2%。由于 A、B 两液混合, pH 从约 7.5 降至 6.2, 故固定时不需再调 pH 值。固定时间为 6~18 h。

3. 应用 该固定剂较适于富含糖类的组织, 对超微结构及许多抗原的抗原性保存较好。其机制是借助于过碘酸氧化组织中的糖类形成醛基, 通过赖氨酸的双价氨基与醛基结合, 从而与糖形成交联。由于组织抗原绝大多数都是由蛋白质和糖两部分构成, 抗原决定簇位于蛋白部分, 故该固定剂有选择性地使糖类固定, 这样既稳定了抗原, 又不影响其在组织中的位置关系。Mclean 和 Nakane 等认为, 最佳的组合是含 0.01 mol/L 的过碘酸盐、0.075 mol/L 的赖氨酸、2% 的多聚甲醛及 0.037 mol/L 的磷酸缓冲液。

六、Karnovsky 液 (pH7.3)

1. 试剂 ①多聚甲醛 30 g, ②25%戊二醛 80 ml, ③0.1 mol/L PB 至 1 000 ml。

2. 配制方法 先将多聚甲醛溶于 0.1 mol/L PB 中, 再加入戊二醛, 最后加入 0.1 mol/L 的 PB 至 1 000 ml, 混匀。

3. 应用 该固定剂适于电镜免疫细胞化学。用该固定液在 4℃短时固定, 比在较低浓度的戊二醛中长时间固定能更好地保存组织的抗原性和细微结构。固定时最好先灌注固定, 然后浸泡固定 10~30 min, 用缓冲液漂洗后即可树脂包埋或经蔗糖溶液处理后用于恒冷切片。

七、0.4% 对苯醌 (parabenzquinone)

1. 试剂 ①对苯醌 4.0 g, ②0.01 mol/L PBS 1 000 ml。

2. 配制方法 称取 4.0 g 对苯醌溶于 1 000 ml 0.01 mol/L 的 PBS 即可。

3. 应用 对苯醌对抗原具有较好的保护作用, 但对超微结构有一定影响, 故常与醛类固定剂混合使用。一般要求临用前配制, 且避免加热助溶, 因加热或放置时间过长, 固定液变为棕色至褐色, 会使组

织标本背景增加,影响观察。此外,对苯醌有剧毒,使用时避免吸入或与皮肤接触。

八、PFG液(parabenzquinone-formaldehyde-glutaraldehyde fixative, PFG)

1. 试剂

①对苯醌 20 g, ②多聚甲醛 15 g, ③25%戊二醛 40 ml, ④0.1 mol/L 二甲酸钠缓冲液至 1 000 ml。

2. 配制方法 先以 500 ml 左右的二甲酸钠缓冲液溶解对苯醌及多聚甲醛, 然后加入戊二醛, 最后加入二甲酸钠缓冲液至 1 000 ml 充分混合。

3. 应用 对苯醌与戊二醛及甲醛联合应用, 即可阻止醛基对抗原的损害, 又不影响超微结构的保存, 故适于多种类抗原的免疫细胞化学, 尤其是免疫电镜的研究。

九、碳二亚酰胺-戊二醛(ECD-G)液

1. 试剂①0.05 mol/L PB 500 ml, ②0.01 mol/L PBS 500 ml③Tris 约 14 g, ④浓 HCl 少许,⑤ECD 10 g, ⑥25%戊二醛 3.5 ml。

2. 配制方法 先以约 500 ml 的 PB 与相同体积的 PBS 混合, 加入 Tris (使其终浓度为 1.4%) 溶解, 以浓 HCl 调 pH 至 7.0。再将事先称取好的 ECD 和戊二醛加入混合液, 振摇后计时, 用 pH 计检测, 约 2~3 min 时, pH 降至 6.6。再以 1 mol/L 的 NaOH 在 4 min 内调 pH 至 7.0。此时, 将该混合固定液加入盛有细胞(经 BPS 漂洗过)的器皿中, 在 23℃固定 7 min 后, 以 PBS 洗去固定液, 即可进一步处理。

3.应用 ECD 即乙基-二甲基氨基丙基碳亚胺盐酸盐 [1-ethyl-3 (3-dimethyl-aminopropyl) -carbodi-imide hydrochloride], 简称乙基-CDI, 常用于多肽类激素的固定, 对酶等蛋白质的固定也有良好效果。ECD 单独应用时, 边缘固定效应重。但与戊二醛、Tris 及 PB 联合应用, 效果明显改善, 细胞质仍可渗透, 利用细胞中抗原的定位, 超微结构保存较好。目前认为是一种用于培养细胞电镜水平免疫细胞化学研究的很好的固定剂。

十、四氧化锇(锇酸, osmic acid, OsO₄)

1. 试剂 OsO₄ 和重蒸水, 根据配方不同需要试剂不同 (见后)。

2. 配制 将洗净装有 OsO₄ 的安瓿加热后, 迅速投入装有溶剂的棕色瓶中, 使安瓿遇冷自破。也可用钻石刀在安瓿上划痕, 洗净后再放入瓶中, 盖好瓶塞, 用力撞击安瓿, 待其破后加溶剂稀释。为保证充分溶解, 应在用前几天配制。

(1) 2% OsO₄ 水溶解 取 OsO₄ 1 g 溶于重蒸水中。此液常作为储备液, 于冰箱中密封保存。

(2) 1% OsO₄-PB

试剂 A: 2.26% NaH₂PO₄·2H₂O 4.15 ml

试剂 B: 2.52% NaOH 8.5 ml

试剂 C: 5.4% 葡萄糖 5 ml

试剂 D: OsO₄ 0.5 g

配制方法: 先分别配好 A、B、C 三种液体, 取 A 液 41.5 ml 与 B 液 8.5 ml 混合, 将 pH 调至 7.3~7.4, 取 A、B 混合液 45 ml 再与 5 ml C 液混合即为 0.12 mol/L PBG。

(3) 1% OsO₄/0.1 mol/L 二甲酸钠缓冲液 (pH7.2~7.4)

①2% OsO₄ 水溶液 10 ml, ②0.2 mol/L 二甲酸钠缓冲液 (pH7.2~7.4) 10 ml。

配制方法: 取 2% OsO₄ 储备液 10 ml 与等量 0.2 mol/L pH7.2~7.4 的二甲酸钠缓冲液充分混合即可。

3. 应用 OsO₄ 是电镜研究所必需的试剂, 常用于后固定。尽管 OsO₄ 主要为脂类固定剂, 但也可与肽类及蛋白质起作用, 形成肽-蛋白质或肽-脂交联。过氧化物酶的反应产物经 OsO₄ 处理后, 电子密度增高, 适于电镜研究。但由于 OsO₄ 的反应产物对光及电子有较明显的吸收能力, 因此在免疫细胞化学染

色前常需去除,去钼在光镜水平常用1%的高锰酸钾,在电镜水平则常用 H_2O_2 来处理。

以上介绍了目前免疫细胞化学中常用的一些固定液。固定液种类还很多,如70%~90%的酒精、丙酮、醋酸酒精(含0.1%~1%醋酸的70%~90%酒精),这些溶液都能促使蛋白质凝固。它们最初只是光学显微镜通用的固定液,但在免疫细胞化学上用其他方法不成功时,也可试用。总之,掌握一个原则:免疫细胞化学中,含重金属的固定液禁用(但Zenker-Formalin可进行短时的固定)。目前多认为,对生物标本较好的固定措施是:用4℃的Karnovsky液灌注固定10~30 min后,接着在pH7.3 0.1mol/L的二甲胍酸钠缓冲液中漂洗过液,这种短时冷固定处理,有助于超微结构和许多肽类抗原的保存。对其他较难保存的抗原可尝试PFG、PLP及Zamboni液等混合固定液。

第二节 缓冲液

免疫细胞化学中应用的缓冲液种类较多,即使是同种缓冲液,其浓度、pH、离子强度等也常常有所不同。在此介绍几种最常用缓冲液的配制。

一、0.2 mol/L (pH7.4) 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer, PB)

1. 试剂 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$

2. 配制方法 配制时,常先配制0.2 mol/L的 NaH_2PO_4 和0.2 mol/L的 Na_2HPO_4 ,两者按一定比例混合即成0.2 mol/L的磷酸盐缓冲液(PB),根据需要可配制不同浓度的PB和PBS。

(1) 0.2 mol/L的 NaH_2PO_4 :称取 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31.2 g (或 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 27.6 g),加重蒸水至1 000 ml溶解。

(2) 0.2 mol/L的 Na_2HPO_4 :称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 71.632 g (或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 53.65 g或 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 35.61 g),加重蒸水至1 000 ml溶解。

(3) 0.2 mol/L pH7.4的PB的配制:取19 ml 0.2 mol/L的 NaH_2PO_4 和81 ml 0.2 mol/L的 Na_2HPO_4 ,充分混合即为0.2 mol/L的PB(pH约为7.4~7.5)。若pH偏高或偏低,可通过改变二者的比例来加以调整,室温保存即可。用双蒸水稀释一倍即可得到0.2 mol/L PB。

二、0.01 mol/L 磷酸盐缓冲生理盐水 (phosphate buffered saline, PBS)

1. 试剂 ①0.2 mol/L PB 50 ml, ②NaCl 8.5~9 g (约0.15 mol/L), ③重蒸水 至1 000 ml。

不同pH值0.2 mol/L PB的配制 (以配制50ml液体计算)

pH (25℃)	0.2 mol/L 的 Na_2HPO_4 (ml)	0.2 mol/L 的 NaH_2PO_4 (ml)
5.8	4.00	46.00
6.0	6.15	43.84
6.2	9.25	40.75
6.6	18.75	31.25
7.0	30.50	19.50
7.2	36.00	14.00
7.4	40.50	9.50
7.6	43.50	6.50
7.8	45.75	4.25
8.0	47.35	2.65

2. 配制方法 称取 NaCl 8.5~9 g 及 0.2 mol/L 的 PB 50 ml, 加入到 1 000 ml 的容量瓶中, 最后加重蒸水至 1 000 ml, 充分摇匀即可。若拟配制 0.02 mol/L 的 PBS, 则 PB 量加倍即可, 依此类推。

3. 应用 PB 和 PBS 是免疫细胞化学实验中最为常用的缓冲液, 0.01 mol/L 的 PBS 主要用于漂洗组织标本及稀释血清等, 其 pH 应在 7.25~7.35 之间, 否则需要调整。0.1 mol/L 的 PB 常用于配制固定液、蔗糖等。一般情况下, 0.2 mol/L PB 的 pH 值稍高些, 稀释成 0.01 mol/L 的 PBS 时, 常可达到要求的 pH 值, 若需调整 pH, 通常是调整 PB 的 pH。

三、Karasson-Schwlt 磷酸盐缓冲液

1. 试剂 ① $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.31 g, ② $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.77 g, ③重蒸水 至 1 000 ml。

2. 配制方法 同前。

3. 应用 该缓冲液主要用于配制 Zamboni's 固定液。

四、0.5 mol/L pH7.6 的 Tris-HCl 缓冲液

1. 试剂 ①Tris (三羟甲基氨基甲烷) 60.57 g, ②1 mol/L HCl 约 420 ml, ③重蒸水 至 1 000 ml。

2. 配制方法 先以少量重蒸水 (300~500 ml) 溶解 Tris, 加入 HCl 后, 用 1 mol/L 的 HCl 或 1 mol/L 的 NaOH 将 pH 调至 7.6, 最后加重蒸水至 1 000 ml。此液为储备液, 于 4℃ 冰箱中保存。免疫细胞化学中常用的 Tris-HCl 缓冲液浓度为 0.05 mol/L, 用时取储备液稀释 10 倍即可。

3. 应用 该液主要用于配制 Tris 缓冲生理盐水 (TBS)、DAB 显色液。

五、Tris 缓冲生理盐水 (Tris buffered saline, TBS)

1. 试剂 ①0.5 mol/L Tris-HCl 缓冲液 100 ml; ②NaCl 3.5 g~9 g (0.15 mol/L), ③重蒸水 至 1000ml。

2. 配制方法 先以重蒸水溶解少许 NaCl, 再加 Tris-HCl 缓冲液, 最后加重蒸水至 1 000 ml, 充分摇匀使 Tris 终浓度为 0.05 mol/L。

3. 应用 TBS 主要用于漂洗标本, 常用于免疫酶技术中。

六、Tris-TBS (PBS)

1. 试剂 ①Triton X-100 10 ml (1%) 或 3 ml (0.3%), ②0.5 mol/L Tris 缓冲液 (pH7.6) 1 000 ml (50 ml) 或 0.2 mol/L 的 PB, ③NaCl 8.5~9 g, ④重蒸水 至 1 000 ml。

2. 配制方法 先以重蒸水溶解少许 NaCl 后, 加入 Triton X-100 及 Tris 缓冲液或 (PB), 最后加重蒸水至 1 000 ml, 充分摇匀。

3. 应用 该液常用浓度为 1% 及 0.3%, 前者主要用于漂洗标本, 后者主要用于稀释血清。

七、0.1 mol/L (pH7.4) 二甲胍酸钠缓冲液

1. 试剂

①0.2 mol/L 二甲胍酸钠 500 ml, ②0.1 mol/L HCl 28 ml, ③蒸馏水 至 1 000 ml。

2. 配制方法 先称取二甲胍酸钠 (分子质量为 214) 42.8 g, 加蒸馏水至 1 000 ml, 使 0.2 mol/L 的二甲胍酸钠溶液; 再取 HCl 1.7 ml 加蒸馏水至 1 000 ml, 配成 0.1 mol/L, 最后取 0.2 mol/L 二甲胍酸钠溶液 500 ml 及 0.1 mol/L HCl 28 ml 混合, 加蒸馏水至 1 000 ml, 即为 0.1 mol/L 的二甲胍酸钠缓冲液。

八、几种常用的不同 pH 值缓冲液的配制表

1. 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH5.7~8.0)

pH	0.2 mol/L (ml)	Na ₂ HPO ₄ (ml)	pH	0.2mol/L (ml)	Na ₂ HPO ₄ (ml)
5.7	93.5	6.5	6.9	45.0	55.0
5.8	92.0	8.0	7.0	39.0	61.0
5.9	90.0	10.0	7.1	33.0	67.0
6.0	87.7	62.3	7.2	28.0	72.0
6.1	85.0	15.0	7.3	23.0	67.0
6.2	81.5	18.5	7.4	19.0	81.0
6.3	77.5	22.5	7.5	16.0	84.0
6.4	73.5	26.5	7.6	13.0	87.0
6.5	68.5	31.5	7.7	10.5	89.5
6.6	62.5	7.5	7.8	8.5	91.5
6.7	56.5	43.5	7.9	7.0	93.0
6.8	51.0	49.0	8.0	5.3	94.7

2. 0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH7.19~9.10)

pH	0.2mol/L Tris (ml)	0.2mol/L HCl (ml)	H ₂ O	pH	0.2mol/L Tris (ml)	0.2mol/L HCl (ml)	H ₂ O
7.19	10.0	18.0	12.0	8.23	10.0	9.0	21.0
7.36	10.0	17.0	13.0	8.32	10.0	8.0	22.0
7.54	10.0	16.0	14.0	8.41	10.0	7.0	23.0
7.66	10.0	14.0	15.0	8.51	10.0	6.0	24.0
7.77	10.0	14.0	16.0	8.62	10.0	5.0	25.0
7.87	10.0	13.0	17.0	8.74	10.0	4.0	26.0
7.96	10.0	12.0	18.0	8.92	10.0	3.0	27.0
8.05	10.0	11.0	19.0	9.10	10.0	2.0	28.0
8.14	10.0	10.0	20.0				

3. 0.2mol/L 醋酸盐缓冲液 (pH3.6~5.6)

pH	0.2mol/L 醋酸 (ml)	0.2mol/L 醋酸钠 (ml)	pH	0.2mol/L 醋酸 (ml)	0.2mol/L 醋酸钠 (ml)
3.6	46.3	3.7	4.8	20.0	30.0
3.8	44.0	6.0	5.0	14.8	35.2
4.0	41.0	9.0	5.2	10.5	39.5
4.2	36.8	13.2	5.4	8.8	41.2
4.4	30.5	19.5	5.6	4.8	45.2
4.6	25.5	24.5			

4. 0.1mol/L 二甲胂酸钠缓冲液 (pH5.0~7.4)

pH	0.2mol/L 二甲胂酸钠 (ml)	0.2 mol/L HCl (ml)	蒸馏水	pH	0.2mol/L 二甲胂酸钠 (ml)	0.2 mol/L HCl (ml)	蒸馏水
5.0	25	23.5	51.5	6.4	25	9.2	65.8
5.2	25	22.5	52.5	6.6	25	6.7	68.3
5.4	25	21.5	53.5	6.8	25	4.7	70.3
5.6	25	19.6	55.5	7.0	25	3.2	71.8
5.8	25	17.4	57.5	7.2	25	2.1	72.9
6.0	25	14.8	60.3	7.4	25	1.4	73.6
6.2	25	11.9	63.1				

注: HCl 可由 HCO_3 代替, 配制成二甲胂酸钠- HNO_3 缓冲液。

5. 0.2mol/L 碳酸盐缓冲液 (pH9.2~10.7)

pH	0.2mol/L Na_2CO_3 (ml)	0.2mol/L NaHCO_3 (ml)	pH	0.2mol/L Na_2CO_3 (ml)	0.2mol/L NaHCO_3 (ml)
9.2	4.0	46.0	10.0	27.5	22.5
9.3	7.5	42.5	10.1	30.0	20.0
9.4	9.5	40.5	10.2	33.0	17.0
9.5	13.0	37.0	10.3	35.5	14.5
9.6	16.0	34.0	10.4	38.5	11.5
9.7	19.5	30.5	10.5	40.5	9.5
9.8	22.0	28.0	10.6	42.5	7.5
9.9	25.0	25.0	10.7	45.0	5.0

第三节 显色液

免疫细胞化学中, 由于抗原-抗体反应所形成的复合物本身无色, 无法直接观察, 因而需借助于某些化学基团的呈色作用, 使其得以显示, 以利于在显微镜下观察。常用的显色液有:

一、DAB (diaminobenzidine) 显色液

1. 试剂 ①DAB 即 3, 3'-二氨基苯联胺 (常用四盐酸盐) 50 mg, ②0.05 mol/L TB 100 ml, ③30% H_2O_2 30~40 μl 。

2. 配制方法 先以少量 0.05 mol/L (pH7.6) 的 TB 溶解 DAB, 然后加入余量 TB, 充分摇匀, 使 DAB 终浓度为 0.05%, 过滤后显色前加入 30% 的 H_2O_2 30~40 μl , 使其终浓度为 0.01%。

3. 应用 DAB 显色液主要用于免疫过氧化物酶法 (如酶标法、PAP 法等), 其终产物可直接在光镜下观察, 也可经 OsO_4 处理后, 增加反应产物的电子密度, 用于电镜观察。但有几点需注意: DAB 溶解要完全, 否则未溶解的颗粒沉积于标本上影响观察; DAB 浓度不宜过高, 否则显色液呈棕色, 增加背景染色; 另外 DAB 有致癌作用, 操作时应戴手套, 尽量避免与皮肤接触, 用后及时彻底冲洗, 接触 DAB 的实验用品最好经洗液浸泡 24 h 后使用。

二、4-氯-1-萘酚 (4-Cl-1-naphthol) 显色液

1. 配方 1 ①4-Cl-1-萘酚 100 mg, ②纯乙醇 10 ml, ③0.05 mol/L TB (pH7.6) 190 ml, ④30% H_2O_2 10 μ l (0.003%)。

2. 配制方法 先将 4-Cl-1-萘酚溶解于乙醇中, 然后加入 TB 19 ml, 用前加入 30% H_2O_2 使其终浓度为 0.005%, 切片显色时间通常为 5~20 min。

3. 配方 2 4-Cl-1-萘酚、N-二甲基甲酰胺 (DMF)、0.05 mol/L TB (pH7.6)、30% H_2O_2 。

4. 配制方法 先将 4-Cl-1-萘酚加入 DMF 中, 加热溶解使呈乳白色, 再加入 TB, 乳白色则为絮状。在 75℃加热 5 min 后加入 H_2O_2 , 搅动使絮状消失, 趁热过滤, 当降至略低于 50℃时放入组织标本 (注意: 温度过高易损伤标本, 过低则易重新出现沉淀), 显色时间通常为 5 min 左右。

5. 应用 4-Cl-1-萘酚的终产物显示蓝色。多数认为最好去除白色沉淀, 但 Larsson 等认为, 白色沉淀可作为背景, 使阳性部位更易观察。由于酒精可溶解 4-Cl-1-萘酚显色的组织标本, 勿用酒精脱水。

三、3-氨基-9-乙基卡唑 (3-amino-9-ethylcarbazole, AEC) 显色液

1. 试剂 ①AEC 20 mg, ②二甲基甲酰胺 (DMF) 2.5 ml, ③0.05 mol/L 醋酸缓冲液 (pH5.5) 50 ml, ④30% H_2O_2 25 ml。

2. 配制方法 先将 AEC 溶于 DMF 中, 再加入醋酸缓冲液充分混匀。临显色前, 加入 30% H_2O_2 , 切片显色时间为 5~20 min。

3. 应用 经该显色液作用后, 阳性部分呈深红色, 加以苏木精或亮绿等作为背景染色, 则效果更佳。由于终产物溶于酒精和水, 故需用甘油封固。

四、TMB 显色液

1. 试剂 TMB、HCl、亚硝基铁氰化钾、无水酒精。

2. 配制方法

(1) 醋酸盐缓冲液 取 1.0 mol/L 的 HCl 190 ml 加入 400 ml 1.0 mol/L 的醋酸钠中混合, 再加蒸馏水稀释至 1 000 ml, 用醋酸或 NaOH 将 pH 调至 3.3。

(2) A 液 取上述缓冲液 5 ml, 溶解 100 mg 亚硝基铁氰化钾, 加蒸馏水 92.5 ml 混合。

(3) B 液 称取 5 mg TMB 加入 2.5 ml 无水酒精中, 可加热至 37℃~40℃直到 TMB 完全溶解。

(4) 孵育液 放入标本前数秒, 取 2.5 ml B 液及 97.5 ml A 液于试管中充分混合 (液体在 20 min 内应保持清亮的黄绿色, 否则可能已有污染)。酶反应时, 加入终浓度为 0.005% 的 H_2O_2 。

(5) 主要显色步骤 组织标本在蒸馏水 (或 PBS) 中漂洗数次 (每次约 10 min~15 min) 后放入未加 H_2O_2 的孵育液中作用 20 min (19℃~30℃), 然后向孵育液中放入 H_2O_2 (每 100 ml 孵育液中加 0.3% 的 H_2O_2 1.0~5.0 ml), 继续孵育 20 min 左右 (19℃~23℃), 捞出标本漂洗数次 (共 30 min 左右)。在 0℃~4℃条件下可在漂洗液中放置 4 h 直至贴片、脱水、封片。也可在贴片前在 1% 的中性红中负染 2~3 min 或在 1% 派诺宁 (pH3.3~3.5) 中负染 5 min 后贴片、脱水、封片。

3. 应用 TMB 即四甲基联苯胺 (tetrazolium) 是一种脂溶性较强的基团, 因此容易进入细胞与细胞器中的 HRP 反应, 且由于这种高度的脂溶性, 使其易形成多聚体, 在 HRP 活性部位产生粗大的、深蓝色沉淀物, 这使得 TMB 成为组化实验中的一种很好的发色团。同时反应产物的沉淀, 使得 HRP 的活性部位更加暴露, 利于酶氧化反应进行。TMB 的反应产物为深蓝色, 利于光镜观察, 且反应产物越聚越大, 常超出单个细胞器的范围 (而 DAB 则被限制在其内), 故 TMB 反应的检测阈较低。由于上述优点, 目前 TMB 常用于光镜及超微结构水平的 HRP 及 HRP-WGA 神经投射的研究。需要注意的是: TMB 显色液中的 A 液和 B 液应在 2 h 内新鲜配制。另外, TMB 是一种较强的皮肤刺激剂, 并有致癌的潜在可能,

故使用时应戴手套及在通风条件下操作。

五、NBT 显色液

1. 试剂

A 液即 5%NBT: 称取 0.5 g NBT 溶于 10 ml 70%的 DMF (二甲基甲胺) 内, 充分混合, 常存于 4℃, 也可装成小份, -20℃保存, 用前复温。

B 液即 5% BCIP: 称取 BCIP 0.5 g 溶于 10 ml 100%的 DMF 内, 混匀。4℃或分装存于-20℃, 用前恢复至室温。

2. 显色液配制 取 A 液 40 μl, 加入到盛有 10 ml 的 0.1 mol/L Tris-HCl (pH9.5, 0.1 mol/L NaCl、5 mmol/L MgCl₂) 的管内, 充分混匀, 再加入 B 液 40 μl, 轻轻混合即可。最好用前新鲜配制。

3. 应用 NBT 即四唑氮蓝 (nitro-blue-tetrazolium), 分子量为 818, 为深蓝色无定形微溶物质。BCIP 即 5-溴-4-氯-3-吲哚-磷酸盐 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate)。当二者存在时, 在碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, AP) 作用下, NBT 被还原形成显微镜下可见的蓝色或紫色沉淀。

第四节 粘附剂

在免疫细胞化学工作中, 由于标本 (如切片) 的脱落常影响工作的质量和速度, 故粘附剂的选择和使用就显得较为重要。

一、铬矾明胶液

1. 试剂 ①铬矾 0.5 g, ②明胶 (gelatine) 5 g, ③H₂O 约 1 000 ml。

2. 配制方法 在 1 000 ml 的烧杯或烧瓶中, 以 500~800 ml H₂O 加热溶解明胶, 待其完全溶解后, 再加入铬矾。注意温度过高易使明胶烧糊, 包被玻片时最好控制水温在 70℃。如有明显残渣, 过滤后使用。

二、甲醛-明胶液

1. 试剂 ①40%甲醛 2.5 ml, ②明胶 0.5 g, ③蒸馏水 至 100 ml。

2. 配制方法 用少许蒸馏水 (约 80 ml) 加热溶解明胶, 待完全溶化后, 加入甲醛, 最后加入蒸馏水至 100 ml 混匀即可。

三、多聚赖氨酸 (poly-L-lysine, PLL)

1. 试剂 ①多聚赖氨酸 5 g, ②蒸馏水 约 1 000 ml。

2. 配制方法 称取 PLL, 溶于 H₂O, 充分混合即可, 此液浓度为 0.5%, 可适当稀释配成 0.01%~0.5% 浓度。4℃保存, 也可-20℃备用。PLL 可反复冰冻, 效果无明显影响, 工作液常再稀释 10~50 倍。

四、Vectabond 试剂

该试剂是 Vector 公司生产的一种新型玻片粘附剂。该试剂与一般的粘附剂不同, 它是通过对玻璃表面起化学修饰作用, 改变其表面的化学物理特性, 使组织切片牢固地贴于玻璃片上, 贴上后不易脱落, 保留时间较久。一个试剂盒 (7 ml) 可配成 350ml 工作液 (用丙酮配)。处理载玻片前 (事先酸处理), 用染色缸装好各种液体, 按下列程序进行: ①干净载玻片经丙酮处理 5 min; ②Vectabond 试剂工作液配制 7 ml Vectabond 加 350ml 丙酮; ③将载玻片用镊子夹住浸入 Vectabond 试剂 1~2 次; ④蒸馏水洗 2 次, 每次 5 min; 37℃干燥过夜, 用铝箔包好, 室温存放备用。注意: 避免污染 (尘埃等)。经上述方法处理的载片一般可存放半年以上。

第五节 封固剂

一、甘油-TBS 及甘油-PBS

1. 试剂 ①配方 1: 甘油 90 ml, 0.01% mol/L PBS 10 ml; ②配方 2: 甘油 75 ml, 0.01% mol/L PBS 25 ml。
2. 配制方法 按比例将甘油和 TBS (或 PBS) 充分混合后, 4℃冰箱静置, 待气泡排除后方可使用。

二、甘油-明胶 (冻)

1. 试剂 ①明胶 10 g, ②甘油 12 ml, ③蒸馏水 100 ml; ④香草酚 少许。
2. 配制方法
称取 1g 明胶溶于温热 (约 40℃) 的蒸馏水中, 充分溶解后过滤, 再加入 12 ml 甘油混合均匀。加入少许香草酚是为了防腐。

三、液体石蜡

液体石蜡因含杂质少, 很少引起非特异性荧光, 故常用于荧光组化及免疫荧光法时标本的封固。

四、DPX

1. 试剂 ①Distrene 10 g, ②酞酸二丁酯 5 ml, ③二甲苯 35 ml。
2. 应用 DPX 为中性封固剂, 用于多种染色方法且不易褪色, 但组织收缩较明显, 故应尽量使其为均匀的一薄层。DPX 现有商品出售, 可直接应用。若过于粘稠, 可加少量二甲苯稀释后应用。注意: 二甲苯不可加得太多, 二甲苯挥发后, 片子上出现许多干燥的空泡, 影响观察, 遇有这种情况, 可用二甲苯浸泡掉盖玻后重新封固。

第六节 酶消化液

一、0.1%胰蛋白酶

1. 试剂 ①胰蛋白酶 0.1 g, ②0.1%氯化钙 (pH7.8) 100 ml。
2. 配制方法 先配制 0.1%的 CaCl_2 , 用 0.1 mol/L 的 NaOH 将其 pH 调至 7.8, 然后加入蛋白酶溶解之。用前将胰蛋白酶消化液在水浴中预热至 37℃ (载有标本的玻片也在 TBS 中预热至同样温度), 该消化液消化时间约为 5~30 min。

二、0.4%胃蛋白酶

1. 试剂 ①胃蛋白酶 400 mg, ②0.1 mol/L HCl 100 ml。
2. 配制方法 同胰蛋白酶。消化时间在 37℃时约为 30 min。

三、0.06% pronase (链霉蛋白酶)

1. 试剂 ①链霉蛋白酶 (pronase) 0.06g, ②0.05 mol/L TB (pH7.5) 100 ml。
2. 配制方法 同前直接配制即可。
3. 应用 在免疫细胞化学染色中, 有时经甲醛液过度固定的标本, 常会产生过量的醛基, 遮盖抗

原,影响一抗与抗原的结合。用蛋白酶溶液消化,可起到暴露抗原部分的作用。消化时间应根据不同组织而异,总之,在保持组织形态不被破坏的前提下,应尽量延长消化时间。以上三种酶消化液中,以1%胰蛋白酶最为常用。

第七节 其他辅助试剂

一、蔗糖溶液

免疫细胞化学中应用的蔗糖常用浓度为5%~30%。一般光镜研究,仅用20%蔗糖处理即可。若制备电镜标本,在冰冻前最好经上行蔗糖(5%、10%、15%、20%及20%蔗糖-5%甘油等)处理,以确保其良好的细微结构。

1. 20%蔗糖液

(1) 试剂 ①蔗糖 20g, ②0.1 mol/L PB (pH7.5) 至100 ml。

(2) 配制方法 先以少许0.1 mol/L的PB溶解蔗糖,再加0.1 mol/L PB至100 ml充分混合,置于4℃冰箱保存。

(3) 应用 该液多用于纯光镜研究。标本在刚放入浓度如此高的蔗糖液时常浮在上面,当标本沉到底部时即可。通常光镜标本浸泡在20%蔗糖液中过夜,都能达到要求。

2. 20%蔗糖-5%甘油:

(1) 试剂 ①蔗糖 20 g, ②甘油 5 ml, ③0.1 mol/L PB 至100 ml (约95 ml)。

(2) 配制方法 先用少许PB溶解蔗糖后,再加入甘油,充分混匀,最后加入PB至100 ml,于4℃保存备用。

(3) 应用 该液主要用于电镜标本的处理,常浸泡过夜(其他浓度的蔗糖常分别为2 h左右)。蔗糖是一种廉价的防冻剂,兼有脱水的作用,它可减小标本在冰冻切片时冰晶形成的数量和大小,应用较为方便。若无试剂蔗糖(sucrose)也可用普通蔗糖(cane sugar)。配制好的蔗糖溶液,如放置时间超过一个月时,应重新配制。

二、Triton X-100 (聚乙二醇辛基苯基醚)

免疫细胞化学中,Triton X-100常用浓度为1%和0.3%,但通常是先配制成30%的Triton X-100储备液,用时稀释至所需浓度。以下是30% Triton X-100的配制方法。

1. 试剂 ①Triton X-100 28.2 ml, ②0.1 mol/L PBS (pH7.3) 或0.05 mol/L TBS (pH7.4) 72.8 ml。

2. 配制方法 取Triton X-100与PBS(或TBS)混合,置于37℃~40℃水浴中2~3 h,使其充分溶解混匀。用前取该储备液稀释至所需浓度。

3. 应用 Triton X-100是一种非离子型表面活性剂(或称清洁剂),分子量为646.86($C_{34}H_{62}O_{11}$)。它能溶解脂质,以增加抗体对细胞膜的通透性。1%的Triton X-100常用于漂洗组织标本,0.3%的Triton X-100则常用于稀释血清,配制BSA等。

三、甲醇-H₂O₂液

1. 试剂 ①纯甲醇 10 ml, ②30% H₂O₂ 0.1 ml。

2. 配制方法 吸取30%的H₂O₂ 0.1 ml,加入100 ml纯甲醇中,充分混匀即可,使H₂O₂终浓度为0.3% (有的用0.03%、0.5%等)。

3. 应用 甲醇-H₂O₂处理组织标本,具有封闭内源性过氧化物酶活性的作用,但其具体机制至今仍不详。通常处理时间在室温约为5~30 min。注意,用H₂O₂处理标本,对某些抗原的抗原性有影响,故建

议在使用新的抗血清或抗原时,最好同时设立非处理对照组。

四、常用生理盐液

1. 常用生理盐液的组成见附表 2-1。

2. 配制方法 精确称取各种药品 (表 2-1), 加入 500 ml 重蒸水中, 待完全溶解后, 补足重蒸水至 1 000 ml, 充分混匀即可。

附表 2-1 常用生理盐液的成分

试剂	Kerbs	Kerbs-Hen-Selsit	Locke	Tyrode	Ringer
NaCl	5.54	6.92	9.00	8.00	6.5
KCl	0.36	0.35	0.42	0.20	0.14
MgCl ₂				0.10	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.29	0.29			
CaCl ₂	0.28	0.28	0.24	0.20	0.12
NaH ₂ PO ₄				0.05	0.01
KH ₂ PO ₄	0.16	0.16			
NaHCO ₃	2.10	2.10	0.15	1.00	0.2
葡萄糖	2.10		1.00	1.00	2.00
丙酮酸	0.43				
富马酸	0.62				
谷氨酸	0.72				

3.应用 在免疫细胞化学实验中,某些物质不宜经固定剂作用或经固定剂作用后仍易丢失,而需浸泡在生理盐液中。这些生理盐液的成分与正常哺乳动物血清的成分相似,能使组织离体后处于尽量接近生理状态时的环境。葡萄糖通常是在用前临时加入。有的(如 Kerbs 液)在使用时通常需通入含 CO₂/O₂ 为 2.5%~5%/95%~97.5%的气体。这些生理盐液中的 CO₂ 和二碳酸盐,主要起缓冲作用,葡萄糖主要是提供离体组织有限的代谢所需的能量。

参考文献

1. Ai J, Gao HH, He SZ, Wang L, Luo DL, Yang BF. Effects of matrine, artemisinin, tetrandrine on cytosolic $[Ca^{2+}]$ in guinea pig ventricular myocytes. *Acta-Pharmacol-Sin*, 2001, 22 (6) : 512~515
2. Alexandratou E, Yova D, Handris P, Kletsas D, Loukas S. Human fibroblast alterations induced by low power laser irradiation at the single cell level using confocal microscopy. *Photochem Photobiol Sci*, 2002, 1 (8) : 547~552
3. Ali SM, Olivo M. Bio-distribution and subcellular localization of Hypericin and its role in PDT induced apoptosis in cancer cells. *Int J Oncol*, 2002; 21 (3) : 531~40
4. Ali SM, Olivo M. Efficacy of hypocrellin pharmacokinetics in phototherapy. *Int J Oncol*, 2002, 21 (6) : 1229~1237
5. Ammon C, Schafer J, Kreuzer OJ, Meyerhof W. Presence of a plasma membrane targeting sequence in the amino-terminal region of the rat somatostatin receptor 3. *Arch Physiol Biochem*, 2002, 110 (1~2) : 137~145
6. Anderson JR, Wilcox MJ, Wade PR, Barrett SF. Segmentation and 3D reconstruction of biological cells from serial slice images. *Biomed Sci Instrum*, 2003, 39: 117~122
7. Arcuri C, Giambanco I, Bianchi R, Donato R. Subcellular localization of S100A11 (S100C, calgizzarin) in developing and adult avian skeletal muscles. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1600 (1~2) : 84~94
8. Anyoshi H, Aono Y, Tsuji Y, Ueda A, Tokunaga M, Uchida K, Sakon M, Monden M. Role of cytoplasmic calcium in platelet aggregation. *Int Angiol*, 2002, 21 (2) : 134~137
9. Beck A, Lohr C, Berthold H, Deitmer JW. Calcium influx into dendrites of the leech Retzius neuron evoked by 5-hydroxytryptamine. *Cell Calcium*, 2002, 31 (3) : 137~149
10. Behrens I, Pena AI, Alonso MJ, Kissel T. Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle adsorption and transport. *Pharm-Res*, 2002, 19 (8) : 1185~1193
11. Belien JA, van-Ginkel HA, Tekola P, Ploeger LS, Poulin NM, Baak JP, van-Diest PJ. Confocal DNA cytometry: a contour based segmentation algorithm for automated three-dimensional image segmentation. *Cytometry*, 2002, 49 (1) : 12~21
12. Brelje TC, Wessendorf MW, Sorenson RL. Multicolor laser scanning confocal immunofluorescence microscopy: practical application and limitations. *Methods Cell Biol*, 2002, 70: 165~244
13. Breuls RG, Mol A, Petterson R, Oomens CW, Baaijens FP, Bouten CV. Monitoring local cell viability in engineered tissues: a fast, quantitative, and nondestructive approach. *Tissue Eng*, 2003, 9 (2) : 269~281
14. Brus C, Santi P, Colombo P, Kissel T. Distribution and quantification of polyethylenimine oligodeoxynucleotide complexes in human skin after iontophoretic delivery using confocal scanning laser microscopy. *J Control Release*, 2002, 84 (3) : 171~181
15. Buttino I, Ianora A, Carotenuto Y, Zupo V, Miralto A. Use of the confocal laser scanning microscope in studies on the developmental biology of marine crustaceans. *Microsc Res Tech*, 2003, 60 (4) : 458~564
16. Castejon OJ, Dailey ME, Apkarian RP, Castejon HV. Correlative microscopy of cerebellar Bergmann glial cells. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 2002; 34 (2) : 131~142
17. Chan WY, Huang H, Tam SC. Receptor-mediated endocytosis of trichosanthin in choriocarcinoma cells. *Toxicology*, 2003, 186 (3) : 191~203
18. Charles CA, Marghoob AA, Busam KJ, Clark-Loeser L, Halpern AC. Melanoma or pigmented basal cell carcinoma: a clinical-pathologic correlation with dermoscopy, in vivo confocal scanning laser microscopy, and routine histology. *Skin Res Technol*, 2002, 8 (4) : 282~287
19. Chen BY, Wei JG, Wang YC, Wang CM, Yu J, Yang XX. Effects of cholesterol on the phenotype of rabbit bile duct fibroblasts. *World J Gastroenterol*, 2003, 9 (2) : 351~355
20. Cheng F, Mani K, van-den-Boorn J, Ding K, Belting M, Fransson LA. Nitric oxide-dependent processing of heparan sulfate in recycling S-nitrosylated glypican-1 takes place in caveolin-1-containing endosomes. *J Biol Chem*, 2002, 277 (46) : 44431~44439
21. Cheranov SY, Jaggar JH. Sarcoplasmic reticulum calcium load regulates rat arterial smooth muscle calcium sparks and transient K^+ (Ca^{2+}) current. *J Physiol*, 2002, 544 (1) : 71~84
22. Chertin B, Rolle U, Farkas A, Puri P. The role of nitric oxide in reflux nephropathy. *Pediatr Surg Int*, 2002, 18 (7) : 630~634
23. Cope SJ, Hibberd S, Whetstone J, MacRae RJ, Melia CD. Measurement and mapping of pH in hydrating pharmaceutical pellets using confocal laser scanning microscopy. *Pharm Res*, 2002, 19 (10) : 1554~1563

24. Dimitrova M, Imbert I, Kieny MP, Schuster C. Protein-protein interactions between hepatitis C virus nonstructural proteins. *J Virol*, 2003, 77 (9) : 5401-5414
25. Dino-Rockel T, von-Mikecz A. Proteasome-dependent processing of nuclear proteins is correlated with their subnuclear localization. *J Struct Biol*, 2002, 140 (1-3) : 189-199
26. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod*, 2002, 28 (10) : 689-693
27. Dmochowski U, Dmochowski JE, Oliveri P, Davidson EH, Fraser SE. Quantitative imaging of cis-regulatory reporters in living embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99 (20) : 12895-12900
28. Dubaj V, Mazzolini A, Wood A, Harris M. Optic fibre bundle contact imaging probe employing a laser scanning confocal microscope. *J Microsc*, 2002, 207 (Pt 2) : 108-117
29. Dubreil L, Biswas SC, Marion D. Localization of puroindoline-a and lipids in bread dough using confocal scanning laser microscopy. *J Agric Food Chem*, 2002, 50 (21) : 6078-6085
30. Duggal N, Iskander S, Hammond RR. MAP2 and nestin co-expression in dysembryoplastic neuroepithelial tumors. *Clin Neuropathol*, 2003, 22 (2) : 57-65
31. Dumas D, Grossin L, Cauchois G, Gentils M, Santus R, Stoltz JF. Comparison of wide-field/deconvolution and confocal microscopy in bioengineering. Interest of multi-photon microscopy in the study of articular cartilage. *Biorheology*, 2003, 40 (1-3) : 253-259
32. Fei Y. Development of the cone photoreceptor mosaic in the mouse retina revealed by fluorescent cones in transgenic mice. *Mol Vis*, 2003, 9: 31-42
33. Garcia-Ruiz C, Colell A, Mari M, Morales A, Calvo M, Enrich C, Fernandez-Checa JC. Defective TNF-alpha-mediated hepatocellular apoptosis and liver damage in acidic sphingomyelinase knockout mice. *J Clin Invest*, 2003, 111 (2) : 197-208
34. Garcia-Ruiz C, Colell A, Morales A, Calvo M, Enrich C, Fernandez-Checa JC. Trafficking of ganglioside GD₃ to mitochondria by tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem*, 2002, 277 (39) : 36443-36448
35. Ge L, Mohwald H, Li J. Polymer-stabilized phospholipid vesicles formed on polyelectrolyte multilayer capsules. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 303 (2) : 653-659
36. Glass-Brudzinski J, Perizzolo D, Brunette DM. Effects of substratum surface topography on the organization of cells and collagen fibers in collagen gel cultures. *J Biomed Mater Res*, 2002, 61 (4) : 608-618
37. Gohda M, Magoshi T, Kato S, Noguchi T, Yasuda S, Nonogi H, Matsuda T. Terminally alkylated heparin 2. Potent antiproliferative agent for vascular smooth muscle cells. *Biomacromolecules*, 2001, 2 (4) : 1178-1183
38. Gong YP, Liu T, Jia YQ, Qin L, Deng CQ, Yang RY. Comparison of P-gp- and MRP-mediated multidrug resistance in leukemia cell lines. *Int J Hematol*, 2002, 75 (2) : 154-160
39. Gonzalez S, Tannous Z. Real-time, in vivo confocal reflectance microscopy of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*, 2002, 47 (6) : 869-874
40. Goud PT, Goud AP, Leybaert L, Van-Oostveldt P, Mikoshiba K, Diamond MP, Dhont M. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor function in human oocytes: calcium responses and oocyte activation-related phenomena induced by photolytic release of InsP3 are blocked by a specific antibody to the type I receptor. *Mol Hum Reprod*, 2002, 8 (10) : 912-918
41. Grams YY, Bouwstra JA. Penetration and distribution of three lipophilic probes in vitro in human skin focusing on the hair follicle. *J Control Release*, 2002, 83 (2) : 253-262
42. Gray JR, Weeks JC. Steroid-induced dendritic regression reduces anatomical contacts between neurons during synaptic weakening and the developmental loss of a behavior. *J Neurosci*, 2003, 23 (4) : 1406-1415
43. Grotz KA, Al-Nawas B, Duschner H. Correlating micromorphology of the pulpal odontoblast seam using confocal laser scanning microscopy and dark field microscopy. *Clin Oral Investig*, 2003, 7 (1) : 59-61
44. Guan Y, Dong P, Wan C, Yang J, He M. The assessment of brain injury with measurement of calcium fluorescent intensity of a vital brain slice. *J Extra Corpor Technol*, 2002, 34 (3) : 185-189
45. Guo L, Burke P, Lo SH, Gandour-Edwards R, Lau D. Quantitative analysis of angiogenesis using confocal laser scanning microscopy. *Angiogenesis*, 2001, 4 (3) : 187-191
46. Halbhauer KJ, Konig K. Modern laser scanning microscopy in biology, biotechnology and medicine. *Ann Anat*, 2003, 185 (1) : 1-20
47. Haraguchi T, Shimi T, Koujin T, Hashiguchi N, Hiraoka Y. Spectral imaging fluorescence microscopy. *Genes Cells*, 2002, 7 (9) : 881-887
48. Hasek J, Trachtulcova P, Kohlwein SD, Streiblova E. Colocalization of cortical microtubules and F-actin in *Dipodascus magnusii* using confocal laser scanning microscopy. *Folia Microbiol (Praha)*, 2003, 48 (2) : 177-182
49. Hassan AN, Frank JF, Qvist KB. Direct observation of bacterial exopolysaccharides in dairy products using confocal scanning laser

- microscopy. *J Dairy Sci*, 2002, 85 (7) : 1705~1708
50. Heckl S, Debus J, Jenne J, Pipkorn R, Waldeck W, Spring H, Rastert R, von-der-Lieth CW, Braun K. CNN-Gd³⁺ enables cell nucleus molecular imaging of prostate cancer cells: the last 600 nm. *Cancer Res*, 2002, 62 (23) : 7018~7024
51. Heyder C, Gloria-Maereker E, Entschladen F, Hatzmann W, Niggemann B, Zanker KS, Dittmar T. Realtime visualization of tumor cell/endothelial cell interactions during transmigration across the endothelial barrier. *J Cancer Res- Clin Oncol*, 2002, 128 (10) : 533~538
52. Hideg E, Barta C, Kalai T, Vass I, Hideg K, Asada K. Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photoinhibition or UV radiation. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43 (10) : 1154~1164
53. Holzinger A, Monajembashi S, Greulich KO, Lutz-Meindl U. Impairment of cytoskeleton-dependent vesicle and organelle translocation in green algae: combined use of a microfocused infrared laser as microbeam and optical tweezers. *J Microsc*, 2002, 208 (2) : 77~83
54. Huang XF, Wang CM, Dai XW, Li ZJ, Pan BR, Yu LB, Qian B, Fang L. Expressions of chromogranin A and cathepsin D in human primary hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2000, 6 (5) : 693~698
55. Hubbuch J, Linden T, Knieps E, Thommes J, Kula MR. Dynamics of protein uptake within the adsorbent particle during packed bed chromatography. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 80 (4) : 359~368
56. Hunter CJ, Matyas JR, Duncan NA. The three-dimensional architecture of the notochordal nucleus pulposus: novel observations on cell structures in the canine intervertebral disc. *J Anat*, 2003, 202 (Pt 3) : 279, 91
57. Hegems E, Pick HM, Vogel H. Monitoring mis-acylated tRNA suppression efficiency in mammalian cells via EGFP fluorescence recovery. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30 (23) : e128
58. Itoh J, Kawai K, Serizawa A, Yamamoto Y, Ogawa K, Matsuno A, Watanabe K, Osamura RY. Three-dimensional imaging of hormone-secreting cells and their microvessel environment in estrogen-induced prolactinoma of the rat pituitary gland by confocal laser scanning microscopy. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2001, 9 (4) : 364~370
59. Itoh J, Serizawa A, Kawai K, Ishii Y, Teramoto A, Osamura RY. Vascular networks and endothelial cells in the rat experimental pituitary glands and in the human pituitary adenomas. *Microsc Res Tech*, 2003, 60 (2) : 231~235
60. Jenniskens GJ, Koopman WJ, Willems PH, Pecker I, Veerkamp JH, van-Kuppevelt TH. Phenotypic knock out of heparan sulfates in myotubes impairs excitation-induced calcium spiking. *FASEB J*, 2003, 17 (8) : 878~880
61. Jinai H, Kitagishi H, Hamano K, Nishikawa Y, Takahashi M. Effect of confinement on phase-separation processes in a polymer blend observed by laser scanning confocal microscopy. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 2003, 67 (2) : 021801
62. Jou MJ, Jou SB, Chen H, Lin CH, Peng TI. Critical role of mitochondrial reactive oxygen species formation in visible laser irradiation-induced apoptosis in rat brain astrocytes (RBA-1). *J Biomed Sci*, 2002, 9 (6) : 507~516
63. Juretschko S, Loy A, Lehner A, Wagner M. The microbial community composition of a nitrifying-denitrifying activated sludge from an industrial sewage treatment plant analyzed by the full-cycle rRNA approach. *Syst Appl Microbiol*, 2002, 25 (1) : 84~99
64. Kahn E, Lizard G, Monier S, Bessede G, Frouin F, Gambert P, Todd-Pokropek A. Flow cytometry and factor analysis evaluation of confocal image sequences of morphologic and functional changes occurring at the mitochondrial level during 7-ketocholesterol-induced cell death. *Anal Quant Cytol Histol*, 2002, 24 (6) : 355~362
65. Karpova TS, Baumann CT, He L, Wu X, Grammer A, Lipsky P, Hager GL, McNally JG. Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J Microsc*, 2003, 209 (1) : 56~70
66. Kawakami Y, Kawakami K, Steelant WF, Ono M, Baek RC, Handa K, Withers DA, Hakomori S. Tetraspanin CD9 is a "proteolipid," and its interaction with alpha 3 integrin in microdomain is promoted by GM3 ganglioside, leading to inhibition of laminin-5-dependent cell motility. *J Biol Chem*, 2002, 277 (37) : 34349~34358
67. Keevil CW. Rapid detection of biofilms and adherent pathogens using scanning confocal laser microscopy and episcopic differential interference contrast microscopy. *Water Sci Technol*, 2003, 47 (5) : 105~116
68. Kiewitz R, Acklin C, Schafer BW, Maco B, Uhrik B, Wuytack F, Erne P, Heizmann CW. Ca²⁺-dependent interaction of S100A1 with the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase2a and phospholamban in the human heart. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 306 (2) : 550~557
69. Kimler VA, Palazzolo KL, Anne P, Haddad MM, Lee JB, Harkins C, Vallarapu B, Taylor JD. Morphological studies on microfilaments and their organizing center in killifish (*Fundulus heteroclitus* L.) melanophores. *Pigment Cell Res*, 2002, 15 (4) : 298~304
70. Kimura R, Ushiyama N, Fujii T, Kawashima K. Nicotine-induced Ca²⁺ signaling and down-regulation of nicotinic acetylcholine receptor subunit expression in the CEM human leukemic T-cell line. *Life Sci*, 2003, 72 (18-19) : 2155~2158
71. Klein C, Pillot T, Chambaz J, Drouet B. Determination of plasma membrane fluidity with a fluorescent analogue of sphingomyelin by

- FRAP measurement using a standard confocal microscope. *Brain Res Brain Res Protoc*, 2003, 11 (1) : 46~51
72. Kolecz J, Rajwa B, Drukala J, Dobrucki J, Korohoda W, Malec E. Three-dimensional visualization of connexin 43 on the human cardiomyocytes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2002, 10 (3) : 247~252
73. Koppelhus U, Awasthi SK, Zachar V, Holst HU, Elbese P, Nielsen PE. Cell-dependent differential cellular uptake of PNA, peptides, and PNA-peptide conjugates. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2002, 12 (2) : 51~63
74. Kotikova EA, Raikova OI, Reuter M, Gustafsson MK. The nervous and muscular systems in the free-living flatworm *Castrella truncata* (Rhabdocoela) : an immunocytochemical and phalloidin fluorescence study. *Tissue Cell*, 2002, 34 (5) : 365~374
75. Kramer SD, Wunderli-Allenspach H. No entry for TAT (44~57) into liposomes and intact MDCK cells: novel approach to study membrane permeation of cell-penetrating peptides. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1609 (2) : 161~169
76. Kress M, Meier T, Steiner R, Dolp F, Erdmann R, Ortmann U, Ruck A. Time-resolved microspectrofluorometry and fluorescence lifetime imaging of photosensitizers using picosecond pulsed diode lasers in laser scanning microscopes. *J Biomed Opt*, 2003, 8 (1) : 26~32
77. Kuang Y, Lepesteur M, Pullammanappallil P, Ho GE. Influence of co-substrates on structure of microbial aggregates in long-chain fatty acid-fed anaerobic digesters. *Lett Appl Microbiol*, 2002, 35 (3) : 190~194
78. Kulms D, Dussmann H, Poppelmann B, Stander S, Schwarz A, Schwarz T. Apoptosis induced by disruption of the actin cytoskeleton is mediated via activation of CD95 (Fas/APO-1). *Cell Death Differ*, 2002, 9 (6) : 598~608
79. Kutsuna N, Hasezawa S. Dynamic organization of vacuolar and microtubule structures during cell cycle progression in synchronized tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43 (9) : 965~973
80. Lionetto MG, Pedersen SF, Hoffmann EK, Giordano ME, Schettino T. Roles of the cytoskeleton and of protein phosphorylation events in the osmotic stress response in eel intestinal epithelium. *Cell Physiol Biochem*, 2002, 12 (4) : 163~78
81. Lipp P, Egger M, Niggli E. Spatial characteristics of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release events triggered by L-type Ca^{2+} current and Na^{+} current in guinea-pig cardiac myocytes. *J Physiol*, 2002, 542 (2) : 383~393
82. Ma XD, Ma X, Sui YF, Wang WL, Wang CM. Signal transduction of gap junctional genes, connexin32, connexin43 in human hepatocarcinogenesis. *World J Gastroenterol*, 2003, 9 (5) : 946~950
83. Machova Z, Muhle C, Krauss U, Trehin R, Koch A, Merkle HP, Beck-Sickinger AG. Cellular internalization of enhanced green fluorescent protein ligated to a human calcitonin-based carrier peptide. *Chembiochem*, 2002, 3 (7) : 672~677
84. Marchetti L, Sabbieti MG, Menghi M, Materazzi S, Hurley MM, Menghi G. Effects of phthalate esters on actin cytoskeleton of Pyla rat osteoblasts. *Histol Histopathol*, 2002, 17 (4) : 1061~1066
85. Martinelli GP, Friedrich VL Jr, Holstein GR. L-citrulline immunostaining identifies nitric oxide production sites within neurons. *Neuroscience*, 2002, 114 (1) : 111~122
86. Menu E, Braet F, Timmers M, Van-Riet I, Van-Camp B, Vanderkerken K. The F-actin content of multiple myeloma cells as a measure of their migration. *Ann NY Acad Sci*, 2002, 973: 124~136
87. Moisenovic M, Tonevitsky A, Agapov I, Niwa H, Schewe II, Bereiter-Hahn J. Differences in endocytosis and intracellular sorting of ricin and viscumin in 3T3 cells. *Eur J Cell Biol*, 2002, 81 (10) : 529~538
88. Moriguchi K, Utsumi M, Maeda H, Kameyama Y, Ohno N. Cytochrome oxidase activity and confocal laser scanning microscopic analysis of the hamster submandibular gland using microwave irradiated fixation. *Scanning*, 2002, 24 (6) : 314~320
89. Muller S, Neusser M, Wienberg J. Towards unlimited colors for fluorescence in-situ hybridization (FISH). *Chromosome Res*, 2002, 10 (3) : 223~232
90. Nakamoto T, Hirono C, Sugita M, Takemoto K, Iwasa Y, Akagawa Y, Shiba Y. Forskolin-induced clearance of the fluorescent dye sulforhodamine from rat parotid intralobular duct lumen: visualization of the secretory function under a confocal laser scanning microscope. *J Membr Biol*, 2002, 190 (3) : 189~196
91. Nakamoto T, Shiba Y, Hirono C, Sugita M, Takemoto K, Iwasa Y, Akagawa Y. Carbachol-induced fluid movement through methazolamide-sensitive bicarbonate production in rat parotid intralobular ducts: quantitative analysis of fluorescence images using fluorescent dye sulforhodamine under a confocal laser scanning microscope. *Eur J Cell Biol*, 2002, 81 (9) : 497~504
92. Nakamura Y, Hirano S, Suzuki K, Seki K, Sagara T, Nishida T. Signaling mechanism of TGF- β 1-induced collagen contraction mediated by bovine trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43 (11) : 3465~3472
93. Nakano A. Spinning-disk confocal microscopy -a cutting-edge tool for imaging of membrane traffic. *Cell Struct Funct*, 2002, 27 (5) : 349~355
94. Nie W, Zhang ZY, Zhou JH. Correlation between mitochondrial membrane potential and neurotoxic effect of corticosterone on primary cultured hippocampal cells. *Sheng Li Xue Bao*, 2001, 53 (6) : 469~472
95. Novak I, Nitschke R, Amstrup J. Purinergic receptors have different effects in rat exocrine pancreas. Calcium signals monitored by

- fura-2 using confocal microscopy. *Cell Physiol Biochem*, 2002, 12 (2-3) : 83-92
96. Ohtake K, Natsume H, Ueda H, Morimoto Y. Analysis of transient and reversible effects of poly-L-arginine on the in vivo nasal absorption of FITC-dextran in rats. *J Control Release*, 2002, 82 (2-3) : 263-275
97. Oikawa H, Masuda T, Kawaguchi J, Sato R. Three-dimensional examination of hepatic stellate cells in rat liver and response to endothelin-1 using confocal laser scanning microscopy. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17 (8) : 861-872
98. Okubo H, Matsushita M, Kamachi H, Kawai T, Takahashi M, Fujimoto T, Nishikawa K, Todo S. A novel method for faster formation of rat liver cell spheroids. *Artif Organs*, 2002, 26 (6) : 497-505
99. Olave MJ, Maxwell DJ. An investigation of neurones that possess the alpha 2C-adrenergic receptor in the rat dorsal horn. *Neuroscience*, 2002, 115 (1) : 31-40
100. Panyi G, Bagdany M, Bodnar A, Vamosi G, Szentesi G, Jenei A, Matyus L, Varga S, Waldmann TA, Gaspar R, Damjanovich S. Colocalization and nonrandom distribution of Kv1.3 potassium channels and CD3 molecules in the plasma membrane of human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 (5) : 2592-2597
101. Park IK, Kim TH, Kim SI, Park YH, Kim WJ, Akaike T, Cho CS. Visualization of transfection of hepatocytes by galactosylated chitosan-graft-poly (ethylene glycol) /DNA complexes by confocal laser scanning microscopy. *Int J Pharm*, 2003, 257 (1-2) : 103-110
102. Park MK, Tepikin AV, Petersen OH. What can we learn about cell signalling by combining optical imaging and patch clamp techniques? *Pflügers-Arch*, 2002, 444 (3) : 305-316
103. Pavlova I, Sokolov K, Drezek R, Malpica A, Follen M, Richards-Kortum R. Microanatomical and biochemical origins of normal and precancerous cervical autofluorescence using laser-scanning fluorescence confocal microscopy. *Photochem Photobiol*, 2003, 77 (5) : 550-555
104. Pitsos MA, Nicolopoulou-Stamati P. DNA spatial distribution in unfertilized human oocytes by confocal laser scanning microscope. *Mol Reprod Dev*, 2002, 62 (3) : 368-374
105. Poole CA, Brookes NH, Clover GM. Confocal imaging of the human keratocyte network using the vital dye 5-chloromethylfluorescein diacetate. *Clin Experiment Ophthalmol*, 2003, 31 (2) : 147-54
106. Popov VI, Medvedev NI, Rogachevskii VV, Ignat'ev DA, Stewart MG, Fesenko EE. Trekhmernaya organizatsiya sinapsov i astroglii v gippokampe krysa i suslikov: novye strukturno-funktsional'nye paradigmy raboty sinapsa. [Three-dimensional organization of synapses and astroglia in the hippocampus of rats and ground squirrels: new structural and functional paradigms of the synapse function]. *Biofizika*, 2003, 48 (2) : 289-308
107. Psarra AM, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G, Sekeris CE, Tsacopoulos M. Mitochondrial localization of glucocorticoid receptor in glial (Müller) cells in the salamander retina. *Glia*, 2003, 41 (1) : 38-49
108. Rasmussen K, Ostgaard K. Adhesion of the marine bacterium *Pseudomonas* sp. NCIMB 2021 to different hydrogel surfaces. *Water Res*, 2003, 37 (3) : 519-524
109. Ribeiro KC, Mariante RM, Coutinho LL, Benchimol M. Nucleus behavior during the closed mitosis of *Tritrichomonas foetus*. *Biol Cell*, 2002, 94 (4-5) : 289-301
110. Ring A, Pohl J, Volkl A, Stremmel W. Evidence for vesicles that mediate long-chain fatty acid uptake by human microvascular endothelial cells. *J Lipid Res*, 2002, 43 (12) : 2095-2104
111. Rodrigues AC, Wuertz S, Brito AG, Melo LF. Three-dimensional distribution of GFP-labeled *Pseudomonas putida* during biofilm formation on solid PAHs assessed by confocal laser scanning microscopy. *Water Sci Technol*, 2003, 47 (5) : 139-142
112. Rokstad AM, Holtan S, Strand B, Steinkjer B, Ryan L, Kulseng B, Skjak-Braek G, Espevik T. Microencapsulation of cells producing therapeutic proteins: optimizing cell growth and secretion. *Cell Transplant*, 2002, 11 (4) : 313-324
113. Rosestolato CT, Dutra Ida-M, De-Souza W, de-Carvalho TM. Participation of host cell actin filaments during interaction of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with host cells. *Cell Struct Funct*, 2002, 27 (2) : 91-98
114. Rothen-Rutishauser B, Riesen FK, Braun A, Gunthert M, Wunderli-Allenspach H. Dynamics of tight and adherens junctions under EGTA treatment. *J Membr Biol*, 2002, 188 (2) : 151-162
115. Saga K. Structure and function of human sweat glands studied with histochemistry and cytochemistry. *Prog Histochem Cytochem*, 2002, 37 (4) : 323-386
116. Saino T, Matsuura M, Satoh YI. Comparison of the effect of ATP on intracellular calcium ion dynamics between rat testicular and cerebral arteriole smooth muscle cells. *Cell Calcium*, 2002, 32 (3) : 153-163
117. Sakyo T, Kitagawa T. Differential localization of glucose transporter isoforms in non-polarized mammalian cells: distribution of GLUT1 but not GLUT3 to detergent-resistant membrane domains. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1567 (1-2) : 165-175

118. Sandovsky-Losica H, Berdicevsky I, Tsarfaty I, Segal E. Effect of *Candida albicans* metabolite (s) on cellular actin. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 215 (1) : 57~62
119. Sauermann K, Gambichler T, Wilmert M, Rotterdam S, Stucker M, Altmeyer P, Hoffmann K. Investigation of basal cell carcinoma [correction of carcionoma] by confocal laser scanning microscopy in vivo. *Skin Res Technol*, 2002, 8 (3) : 141~147
120. Schad A, Fahimi HD, Volkl A, Baumgart E. Expression of catalase mRNA and protein in adult rat brain: detection by nonradioactive in situ hybridization with signal amplification by catalyzed reporter deposition (ISH-CARD) and immunohistochemistry (IHC) /immunofluorescence (IF). *J Histochem Cytochem*, 2003, 51 (6) : 751~760
121. Schimmer C, Neubauer A. The equine herpesvirus 1 UL11 gene product localizes to the trans-golgi network and is involved in cell-to-cell spread. *Virology*, 2003, 308 (1) : 23~36
122. Sell M, Boldt W, Markwardt F. Desynchronising effect of the endothelium on intracellular Ca^{2+} concentration dynamics in vascular smooth muscle cells of rat mesenteric arteries. *Cell Calcium*, 2002, 32 (3) : 105~120
123. Sguilla FS, Tedesco AC, Bendhack LM. A membrane potential-sensitive dye for vascular smooth muscle cells assays. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 301 (1) : 113~118
124. Sharpe J. Optical projection tomography as a new tool for studying embryo anatomy. *J Anat*, 2003, 202 (2) : 175~181
125. Sheehan KA, Blatter LA. Regulation of junctional and non-junctional sarcoplasmic reticulum calcium release in excitation-contraction coupling in cat atrial myocytes. *J Physiol*, 2003, 546 (1) : 119~135
126. Shen Z, Lin J, Li M, Zeng Q. Study on the expression of connexin 43 in human nasopharyngeal carcinoma. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, 2002, 16 (8) : 40 (2~3) , 406
127. Shen Z, Wang H, Wang H, Lin J, Chen Y, Song D. The effects of BDP on calcium ion in the granular leukocytes in nasal secretions of the patients with allergic rhinitis. *Lin Chuang Er Bi Yan Hou Ke Za Zhi*, 2002, 16 (1) : 25~26
128. Silva CC, Groome NP, Knight PG. Immunohistochemical localization of inhibin/activin alpha, betaA and betaB subunits and follistatin in bovine oocytes during in vitro maturation and fertilization. *Reproduction*, 2003, 125 (1) : 33~42
129. Simeonova NB, Kegel WK. Real-space fluorescence recovery after photo-bleaching of concentrated suspensions of hard colloidal spheres. *Faraday Discuss*, 2003, 123: 27~35, discussion 75~97, 419~421
130. Sole A, Gaju N, Esteve I. The biomass dynamics of cyanobacteria in an annual cycle determined by confocal laser scanning microscopy. *Scanning*, 2003, 25 (1) : 1~7
131. Stanley NR, Britton RA, Grossman AD, Lazazzera B-A. Identification of catabolite repression as a physiological regulator of biofilm formation by *Bacillus subtilis* by use of DNA microarrays. *J Bacteriol*, 2003, 185 (6) : 1951~1957
132. Stevenson D, Wokosin D, Girkin J, Grant MH. Measurement of the intracellular distribution of reduced glutathione in cultured rat hepatocytes using monochlorobimane and confocal laser scanning microscopy. *Toxicol In Vitro*, 2002, 16 (5) : 609~619
133. Su Q, Fu Y, Liu YF, Zhang W, Liu J, Wang CM. Laminin induces the expression of cytokeratin 19 in hepatocellular carcinoma cells growing in culture. *World J Gastroenterol*, 2003, 9 (5) : 921~929
134. Su ZL, Li N, Sun YR, Yang J, Wang IM, Jiang SC. [Monitoring calcium in outer hair cells with confocal microscopy and fluorescence ratios of fluo-3 and fura-red] *ShiYanShengWuXueBao*, 1998, 31 (4) : 323~331
135. Suzuki M, Ushijima N, Kohno A, Sawa Y, Yoshida S, Sekikawa M, Ohtaishi N. Plastic casts and confocal laser scanning microscopy applied to the observation of enamel tubules in the red Kangaroo (*Macropus rufus*). *Anat Sci Int*, 2003, 78 (1) : 53~61
136. Suzuki-Yamamoto T, Toida K, Watanabe K, Ishimura K. Immunocytochemical localization of prostaglandin F synthase II in the rat spinal cord. *Brain Res*, 2003, 969 (1~2) : 27~35
137. Takahashi M, Nagao T, Imazeki Y, Matsuzaki K, Minamitani H. Roles of reactive oxygen species in monocyte activation induced by photochemical reactions during photodynamic therapy. *Front Med Biol Eng*, 2002, 11 (4) : 279~294
138. Tay ST, Ivanov V, Yi S, Zhuang WQ, Tay JH. Presence of anaerobic bacteroides in aerobically grown microbial granules. *Microb Ecol*, 2002, 44 (3) : 278~285
139. Theiss C, Meller K. Microinjected anti-actin antibodies decrease gap junctional intercellular communication in cultured astrocytes. *Exp Cell Res*, 2002, 281 (2) : 197~204
140. Timmers M, Vermijlen D, Vekemans K, De-Zanger R, Wisse E, Braet F. Tracing DiO-labelled tumour cells in liver sections by confocal laser scanning microscopy. *J Microsc*, 2002, 208 (1) : 65~74
141. Toh SK, Tay JH, Moy BY, Ivanov V, Tay ST. Size-effect on the physical characteristics of the aerobic granule in a SBR. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 60 (6) : 687~695
142. Tsutsui S, Itagaki S, Kawamura S, Harada K, Karaki H, Doi K, Yoshikawa Y. D-galactosamine induced hepatocyte apoptosis is inhibited in vivo and in cell culture by a calcium calmodulin antagonist, chlorpromazine, and a calcium channel blocker, verapamil. *Exp*

- Anim, 2003, 52 (1) : 43~52
143. Ueda T, Nakajima M, Akazawa H, Marubashi Y, Shimoyama H, Sakagami Y, Takagawa K, Kamitsuji H, Naito I, Sado Y, Yoshioka A. Quantitative analysis of glomerular type IV collagen alpha3-5 chain expression in children with thin basement membrane disease. *Nephron*, 2002, 92 (2) : 271~278
144. Ueda T, Taniguchi S, Kawata T, Mizuguchi K, Nakajima M, Yoshioka A. Does skeletonization compromise the integrity of internal thoracic artery grafts? *Ann Thorac Surg*, 2003, 75 (5) : 1429~1433
145. Uemura T, Yoshimura SH, Takeyasu K, Sato MH. Vacuolar membrane dynamics revealed by GFP-AtVam3 fusion protein. *Genes Cells*, 2002, 7 (7) : 743~753
146. Uttenweiler D, Kirsch W-, Schulzke E, Both M, Fink RH. Model-based analysis of elementary Ca^{2+} release events in skinned mammalian skeletal muscle fibres. *Eur Biophys J*, 2002, 31 (5) : 331~340
147. Van-Dalen G. Determination of the water droplet size distribution of fat spreads using confocal scanning laser microscopy. *J Microsc*, 2002, 208 (2) : 116~133
148. Viard M, Parolini I, Sargiacomo M, Fecchi K, Ramoni C, Ablan S, Ruscetti FW, Wang JM, Blumenthal R. Role of cholesterol in human immunodeficiency virus type 1 envelope protein-mediated fusion with host cells. *J Virol*, 2002, 76 (22) : 11584~11595
149. Wang CM, Huang XF, Yang JL, Huang M, Li XD, Chen D. Coexistence of adrenocorticotropin and secretogranin in the rat pituitary gland after brain injury. *Chinese Journal of Neuroanatomy*, 2000, 16 (4) : 337~340
150. Wang Y, Li XM, Wang HY. [IL-1beta stimulates alpha-smooth muscle actin expression through JNK/p38 signal pathway in cultured rat mesangial cells] *ShengLiXueBao*, 2002, 54 (3) : 244~50
151. Westedt U, Barbu-Tudoran L, Schaper AK, Kalinowski M, Alfke H, Kissel T. Deposition of nanoparticles in the arterial vessel by porous balloon catheters: localization by confocal laser scanning microscopy and transmission electron microscopy. *AAPS PharmSci*, 2002, 4 (4) : 41
152. White C, McGeown G. Imaging of changes in sarcoplasmic reticulum [Ca^{2+}] using Oregon Green BAPTA 5N and confocal laser scanning microscopy. *Cell Calcium*, 2002, 31 (4) : 151~159
153. Winkler R, Perner B, Rapp A, Durm M, Cremer C, Greulich KO, Hausmann M. Labelling quality and chromosome morphology after low temperature FISH analysed by scanning far-field and near-field optical microscopy. *J Microsc*, 2003, 209 (1) : 23~33
154. Witz CA, Cho S, Centonze VF, Montoya-Rodriguez IA, Schenken RS. Time series analysis of transmesothelial invasion by endometrial stromal and epithelial cells using three-dimensional confocal microscopy. *Fertil-Steril*, 2003, 79 Suppl 1: 770~778
155. Wu LY, Ding AS, Ma Q, Wang FZ, Fan M. [Correlation between enhanced anoxic tolerance induced by hypoxic preconditioning and the stability of mitochondrial membrane potential in cultured hypothalamic cells] *ShengLiXueBao*, 2001, 53 (2) : 93~96
156. Wu Y, Li B, Gao XM. Selective fluorescence of zymogen granules of pancreatic acinar cells stained with hematoxylin and eosin. *Biotech Histochem*, 2002, 77 (5~6) : 291~293
157. Xavier JB, White DC, Almeida JS. Automated biofilm morphology quantification from confocal laser scanning microscopy imaging. *Water Sci Technol*, 2003, 47 (5) : 31~37
158. Xu NG, Yi W, Lai XS. [Effect of electro-acupuncture on calcium content in neurocytes of focal cerebral ischemia] . *Zhongguo ZhongXiYi JieHe ZaZhi*. 2002;22 (4) : 295~297
159. Yamasaki M, Chujo H, Koga Y, Oishi A, Rikimaru T, Shimada M, Sugimachi K, Tachibana H, Yamada K. Potent cytotoxic effect of the trans10, cis12 isomer of conjugated linoleic acid on rat hepatoma dRLh-84 cells. *Cancer Lett*, 2002, 188 (1~2) : 171~180
160. Ye J, Yao K, Zeng Q, Lu D. Changes in gap junctional intercellular communication in rabbits lens epithelial cells induced by low power density microwave radiation. *Chin Med J (Engl)*, 2002, 115 (12) : 1873~1876
161. Yoneyama K. Three-dimensional visualization of bile canaliculi by confocal laser scanning microscopy. *J Cell Mol Med*, 2002, 6 (3) : 426~427
162. Yoshioka K, Yoshioka N, Ejiri S, Iwaku M, Ozawa H. Odontoblast processes in human dentin revealed by fluorescence labeling and transmission electron microscopy. *Histochem Cell Biol*, 2002, 118 (3) : 205~212
163. Yoshida A, Kuramitsu HK. *Streptococcus mutans* biofilm formation: utilization of a *gtfB* promoter-green fluorescent protein (*PgtfB::gfp*) construct to monitor development. *Microbiology*, 2002, 148 (11) : 3385~3394
164. Zhang HS, Song LH, Wang L, Qin YH. Lead can inhibit NMDA, K^+ , QA/KA-induced increases in intracellular free Ca^{2+} in cultured rat hippocampal neurons. *Biomed Environ Sci*, 2002, 15 (4) : 330~340
165. Zhang Q, Zhou SY, Liu XL, Niu C, Xu L, Chen SJ. Role of the three-dimensional distribution of *abl* and *bcr* genes in the formation of *bcr/abl* fusion gene in interphase nucleus. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22 (3) : 197~199
166. Zheng G, Li H, Zhang M, Lund-Katz S, Chance B, Gluckson JD. Low-density lipoprotein reconstituted by pyropheophorbide

cholesteryl oleate as target-specific photosensitizer. *Bioconj Chem*, 2002, 13 (3) : 392~396

167. Zhou Z, Yang H, Zhang Z. Role of calcium in phototoxicity of 2-butylamino-2-demethoxy-hypocrellin A to human gastric cancer MGC-803 cells. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1593 (2~3) : 191~200

168. 黄晓峰, 刘彦仿, 王春梅, 杨守京, 张远强. 可溶性免疫复合物在肾综合征出血热发病中的作用—共聚焦显微镜观察. 第四军医大学学报, 1997, 18 (专刊): 4~7

169. 黄晓峰, 王春梅, 刘彦仿, 杨守京, 张远强. 肾综合征出血热发病中不溶性免疫复合物的作用. 第四军医大学学报, 1997, 18 (专刊): 30~37

170. 黄晓峰, 王春梅, 戴晓汶, 潘伯荣, 俞邰斌, 方丽, 钱斌, 赵一岭. 组织蛋白酶 D 和嗜铬颗粒素 A 在人原发性肝细胞癌的表达意义. 华人消化杂志, 1998, 6 (6): 474~478

171. 王春梅, 黄晓峰, 赵经纬, 张远强, 刘惠玲. 嗜铬颗粒素 C 在垂体前叶的免疫组织化学定位及其与促肾上腺皮质激素细胞的关系. 第四军医大学学报, 1997, 18 (专刊): 8~10

172. 王春梅, 郭海涛, 杨家冀, 黄晓峰, 陈丹, 朱妙章. 乳鼠心成纤维细胞波形蛋白和线粒体表达的激光扫描共聚焦显微镜观察. 第四军医大学学报, 2002, 23 (11): 983~985

173. 王春梅, 黄晓峰, 戴晓汶, 潘伯荣, 李振江, 冯蕾. 用激光扫描共聚焦显微镜的软件进行消化学分子共存分析. 世界华人消化杂志, 1999, 7 (9): 746~752

174. 王春梅, 黄晓峰, 戴晓汶, 赵一岭, 苏勤. 激光共聚焦显微镜研究大白鼠肝癌 FSK7902 细胞系的实体瘤中角蛋白和嗜铬颗粒素 A 的关系. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1999, 8 (2) : 170~172

175. 王春梅, 黄晓峰, 李玉松, 王文勇. 激光扫描共聚焦显微镜与荧光显微镜在医学研究中的比较. 第四军医大学学报, 1997, 18 (专刊): 62~63

176. 王春梅, 黄晓峰, 潘伯荣, 戴晓汶, 马福成, 赵一岭. 胰腺导管癌细胞表达嗜铬颗粒素 C/分泌颗粒素 II 和胰抑素. 华人消化杂志, 1998, 6 (6): 470~473

177. 王春梅, 黄晓峰, 王晓峰. 钙荧光探针及其在医学研究中的应用. 第四军医大学学报, 1997, 18 (专刊): 64~66

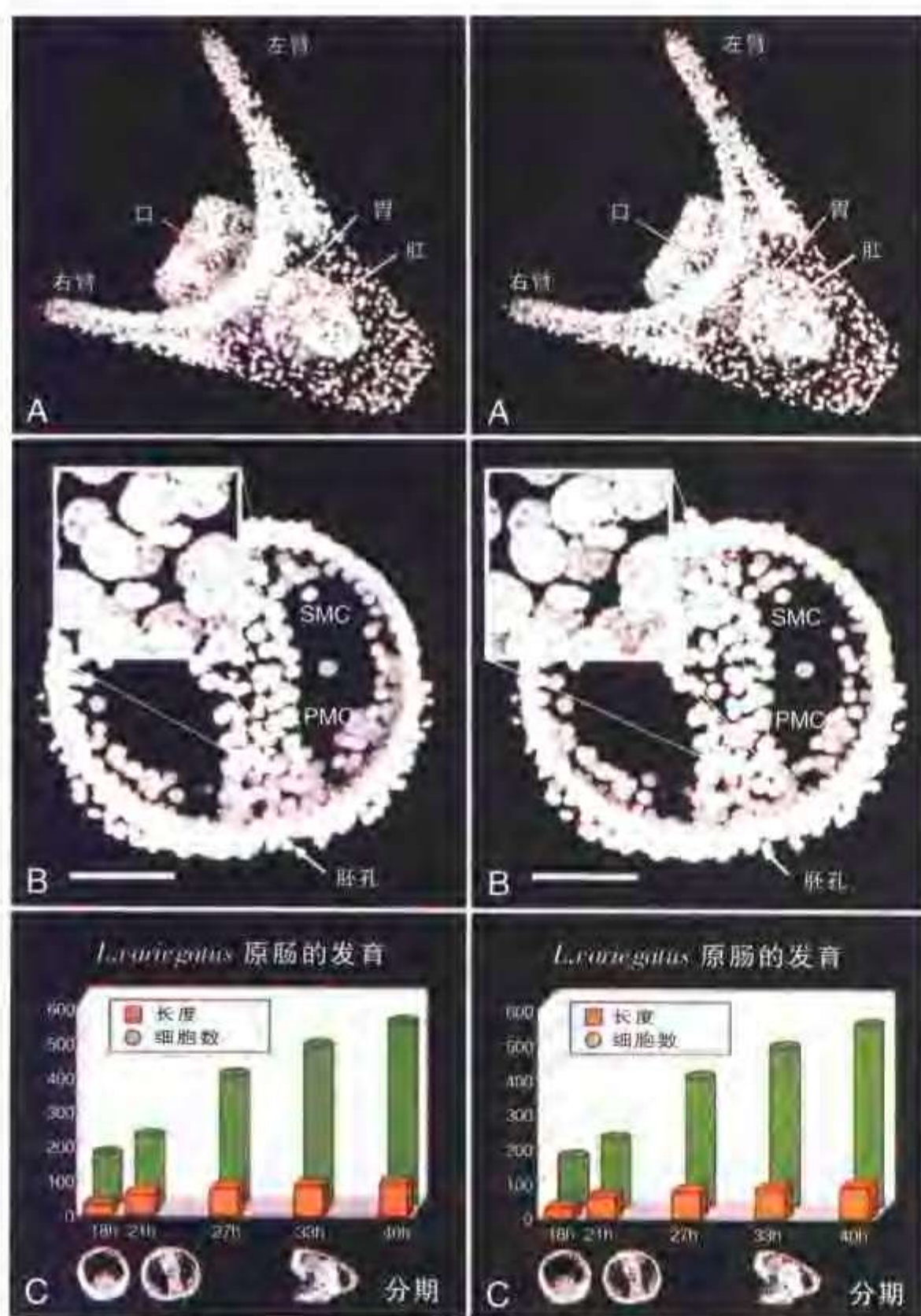
178. 王春梅, 黄晓峰, 臧益民. 激光扫描共聚焦显微镜的原理及其在医学研究中的应用. 第四军医大学学报, 1997, 18 (专刊): 59~62

179. 王春梅, 黄晓峰, 张远强, 刘彦仿, 赵一岭, 苏勤. 大鼠肝癌细胞系实体瘤细胞角蛋白和嗜铬颗粒素 A 的表达: 激光共聚焦显微镜研究. 细胞与分子免疫学杂志, 1997, 13 (增刊): 35~36

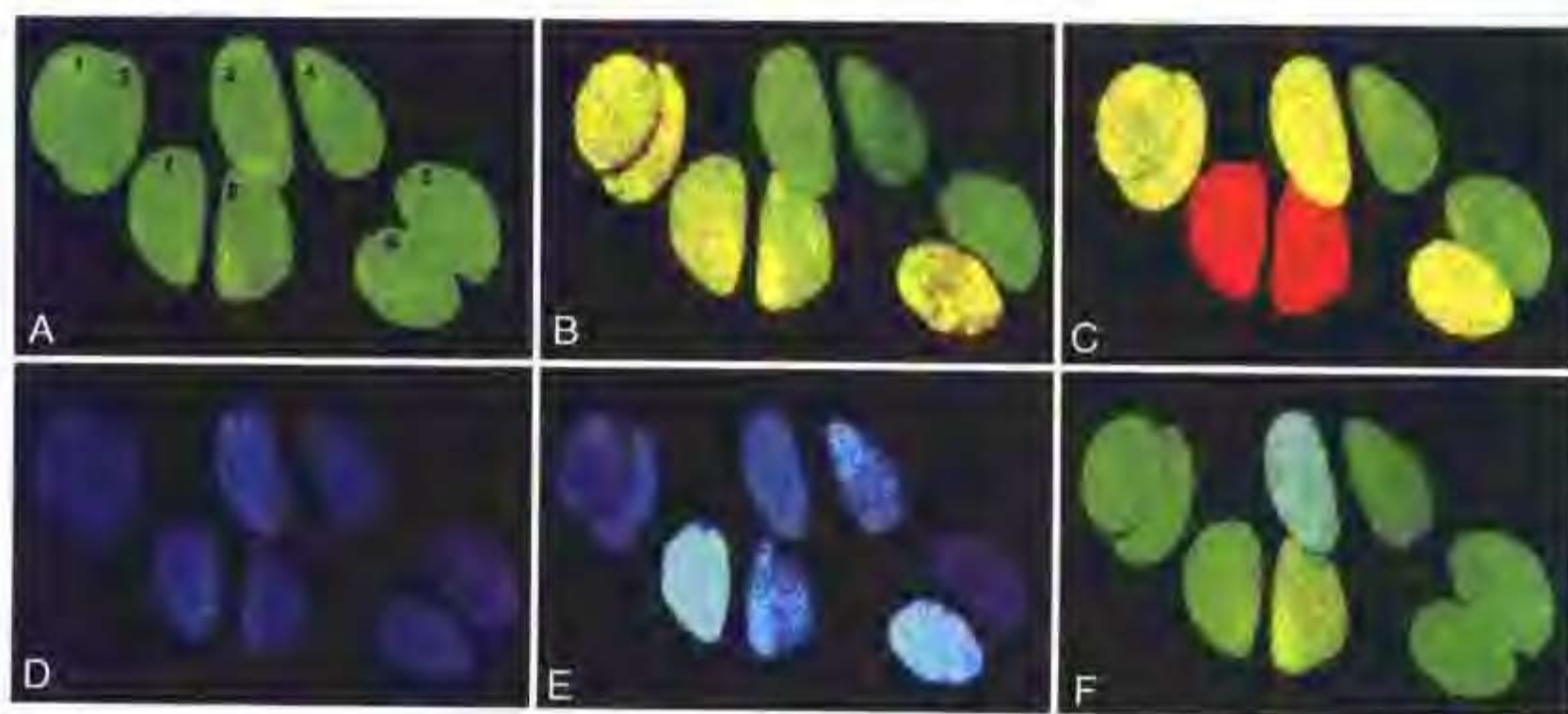
180. 赵经纬, 王百忍, 王春梅. 大鼠三叉神经感觉核簇内 CGRP 样免疫阳性的和 BS I-B4 标记的纤维和终末的关系. 第四军医大学学报, 1997, 18 (专刊): 46~48

181. 赵经纬, 王百忍, 王春梅. 大鼠三叉神经感觉核簇内 P 物质免疫阳性的和 BS I-B4 标记的纤维及终末的关系. 第四军医大学学报, 1997, 18 (专刊): 49~51

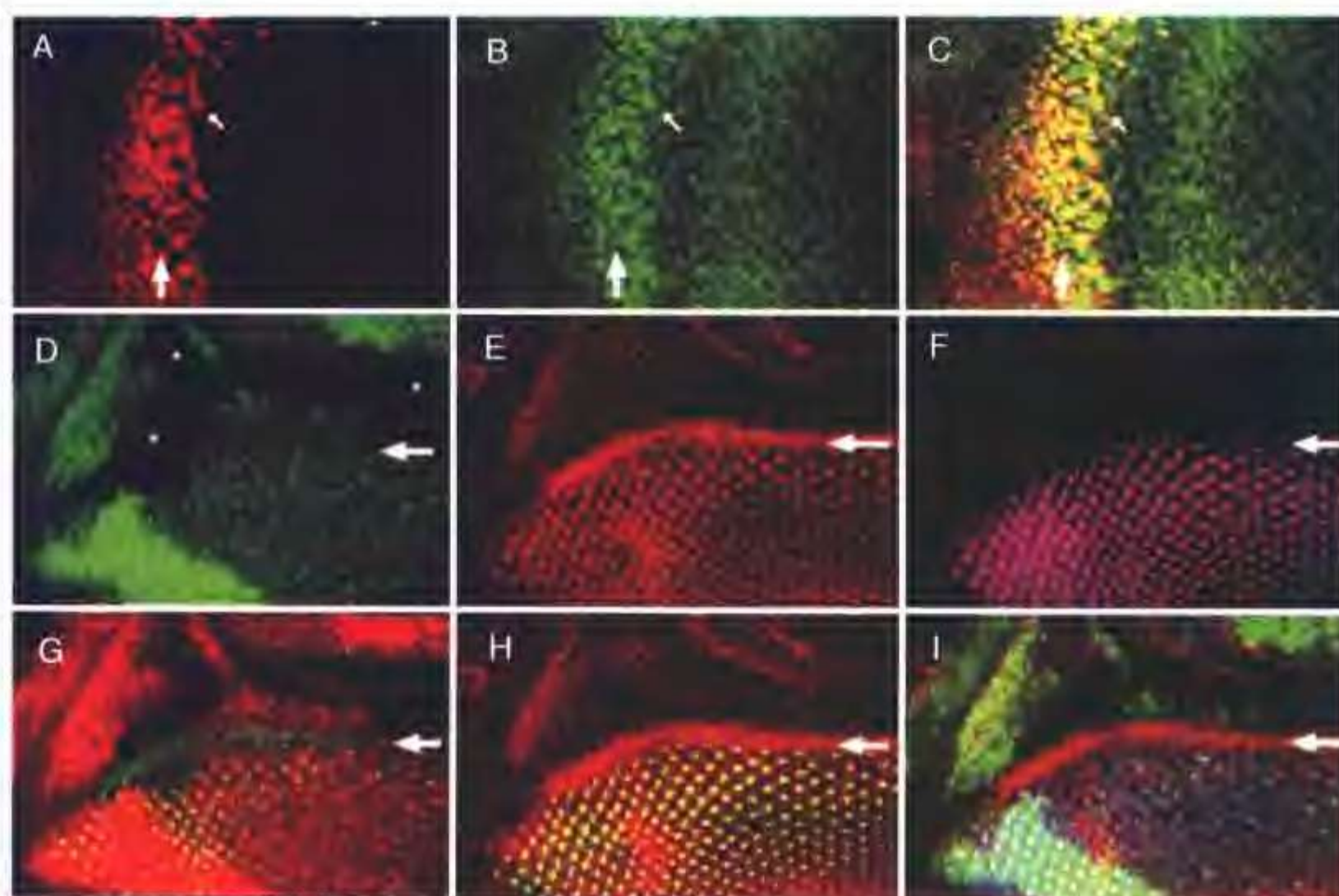
182. 周泽渊, 倪龙兴, 吴补领, 黄晓峰, 王胜朝. 用激光共聚焦显微镜研究菌斑生物膜的结构. 牙体牙髓牙周病学杂志, 2001, 11 (3): 152~153



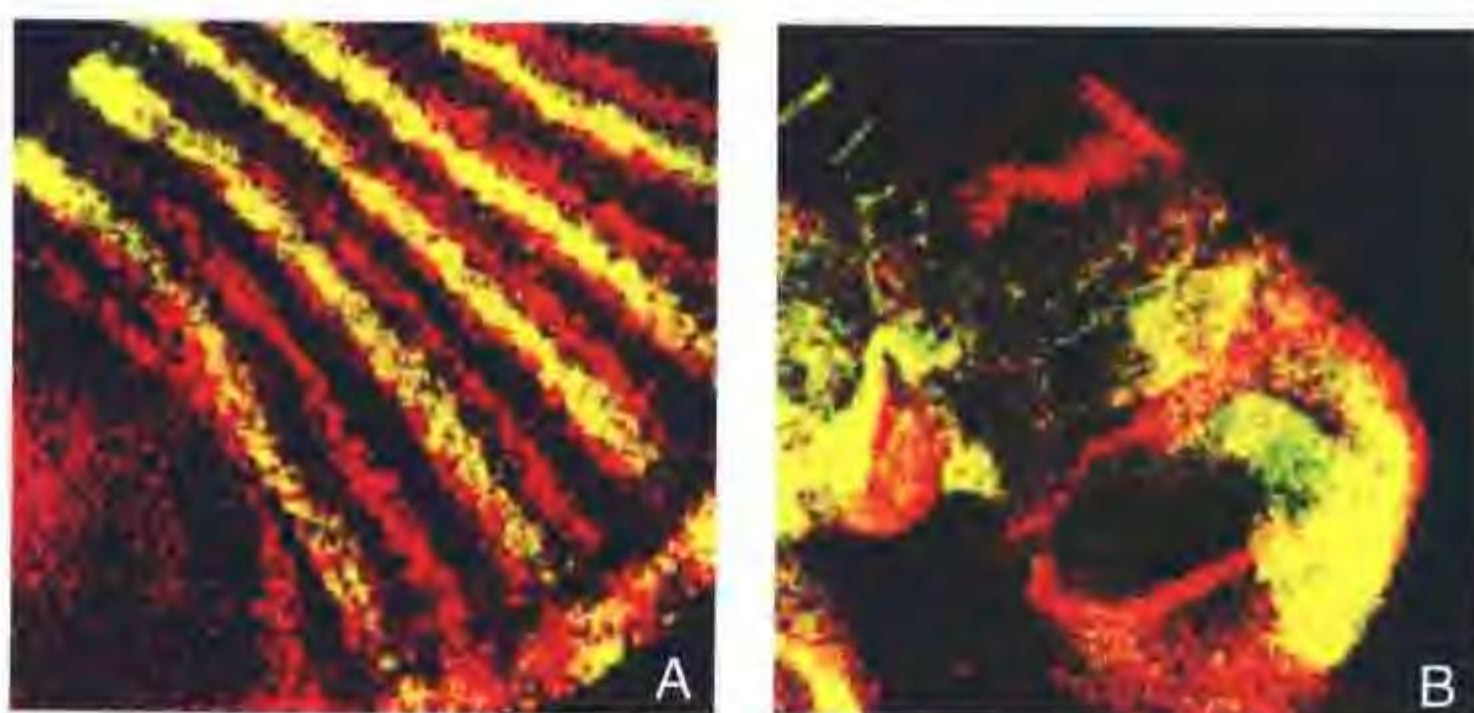
彩图1 用平行视线观察法得到的3D图像。A: 40h *L. variegatus* 海胆幼虫, 细胞核清晰可见, 其他结构也进行了标记; B: 21h 的海胆囊胚, 插图显示原肠壁核分裂象的放大; C: 体视学3D图像, 表示随着海胆的发育细胞数量和原肠的长度都在不断增加。SMC: 次级间充质细胞, PMC: 初级间充质细胞 (引自 Paddock, 1999)



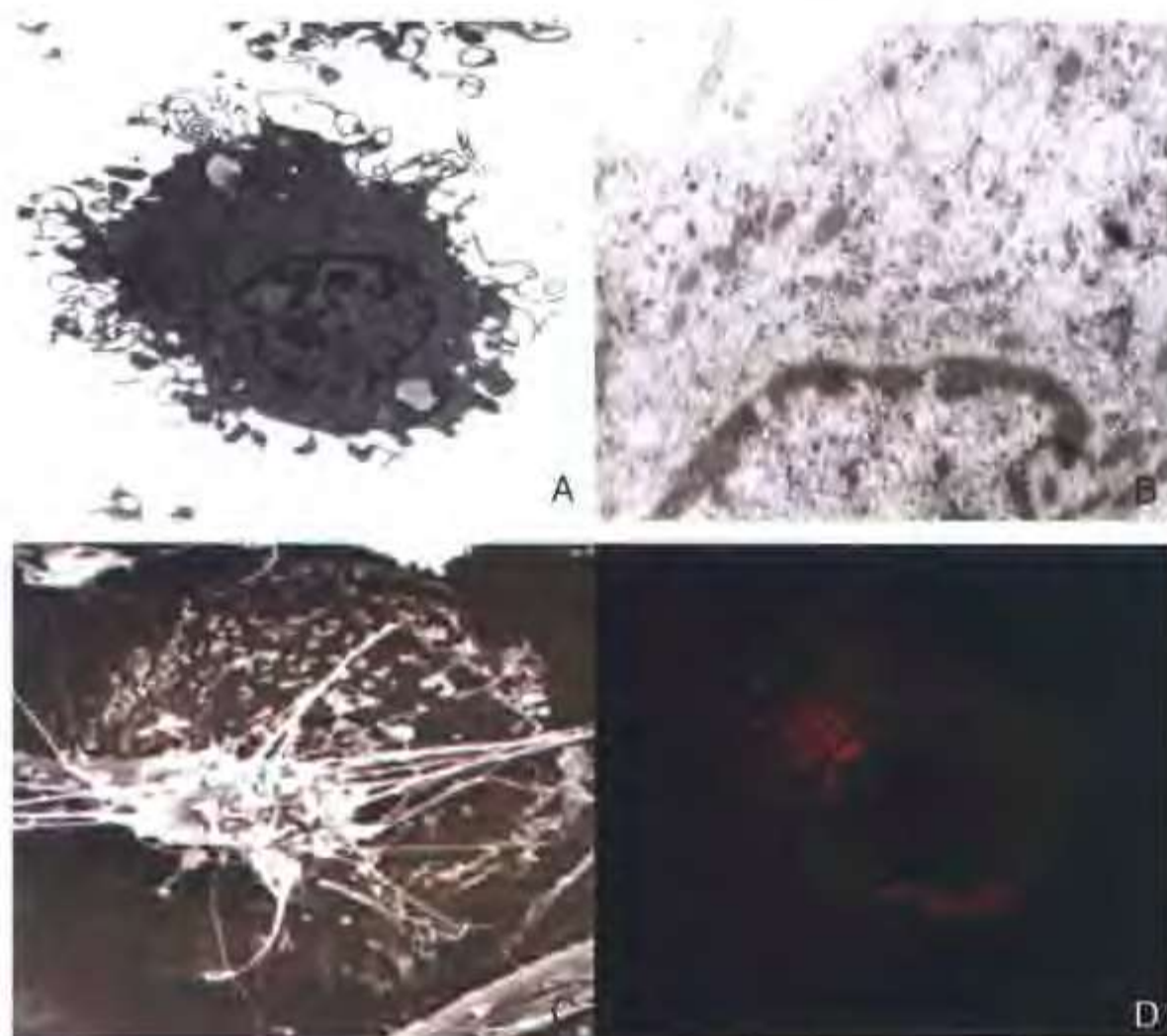
彩图2 经过体积调节的软骨细胞原位4D可视化, 在加载渗透压负荷的生理学实验的1h内测6个时间点 (A-F), 每个时间点的3D共聚焦荧光图像被可视化为高度代码投影。A: 0min (280mosmol/L); B, C: 5-15min (140mosmol/L 低渗肿胀刺激); D: 20min (380mosmol/L 高渗收缩刺激); E, F: 25-60min (380mosmol/L), 调节性体积增大的细胞反应 (引自 Paddock, 1999)



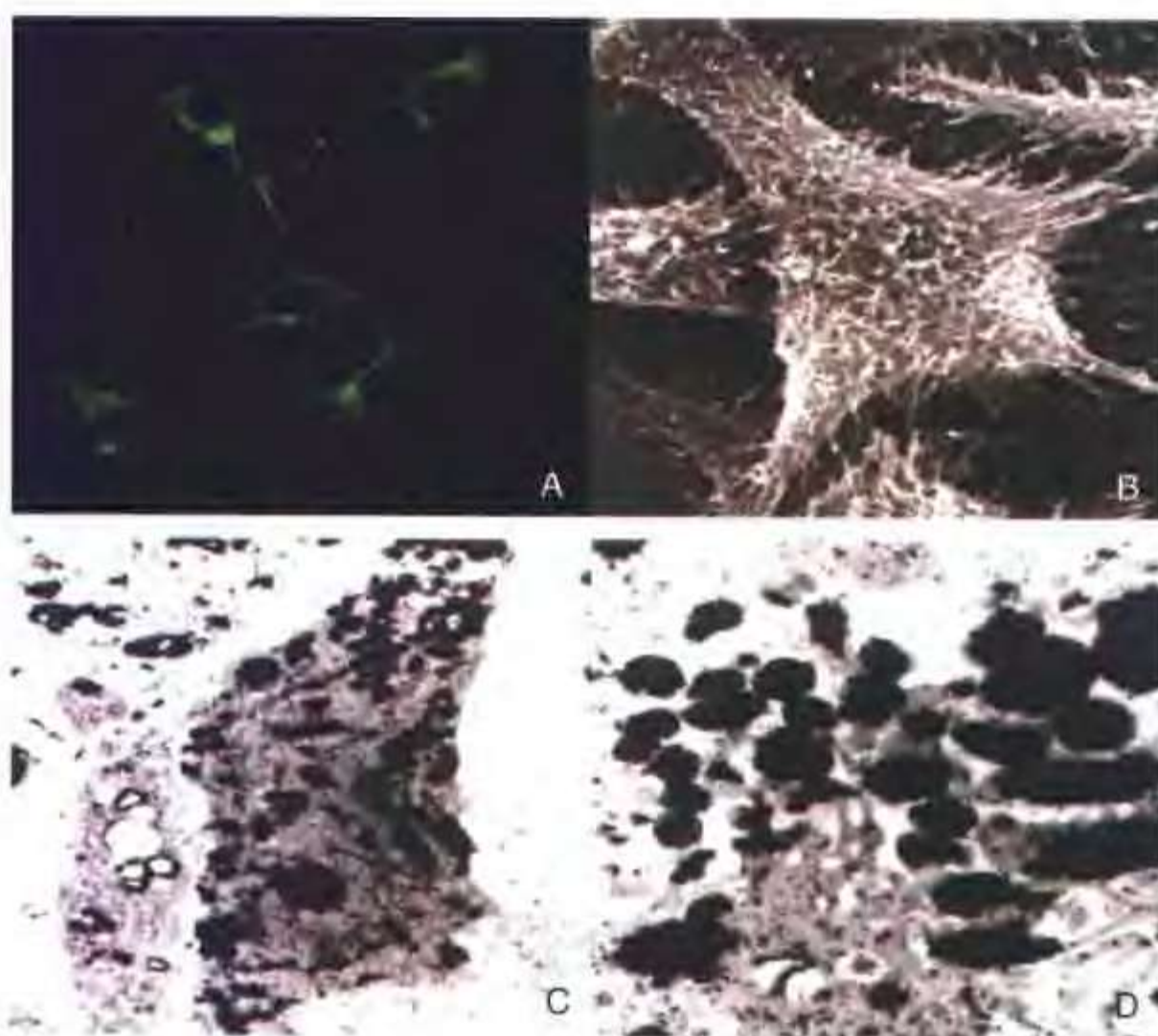
彩图3 果蝇眼视盘的双标和三标结果。A-C：用兔抗 Atonal (A, C 中红色) 和小鼠抗 Daughterless (B, C 中绿色) 标记的野生型眼视盘的共聚焦图像。A, B 为单标图像, C 为复合图像。小箭头指示的为两种抗体染色的细胞核。D-I：一个含有突变和嵌合体毛发组织的 3 幼龄眼板的共聚焦图像。用抗 myc (D, G, I), 罗丹明-次毒蕈环肽 (E, G, H, I), 22C10 (F, H, I) 进行三标记。单标图像为 D-F, 不同双标组合的图像为 G, H, 三标复合图像为 I。D：三组细胞被 myc 抗原标记。左下方最亮的绿色细胞为纯合的野生型, 其他绿色稍弱的细胞为毛发突变体杂合的细胞。那些不表达 myc 的细胞 (星号标记的黑色区域) 是纯合的毛发突变体细胞。Myc 的表达在 D, I 为绿色, 在 E 为红色。次毒蕈环肽染色在 E, H, I 为红色, 在 G 为绿色。22C10 表达在 F 为粉红色, 在 H 为绿色, 在 I 为蓝色。在各图中前部为上, 箭头表示形态发生沟的位置 (引自 Paddock, 1999)



彩图4 果蝇双标记结果。A：显示细胞性胚盘胚胎的躯干区, 左侧为 wg 转录物 (Cy3 通道, 红色部分), ftz 转录物 (Cy2 通道, 绿色部分); B：显示 wg 转录物检测的翼成虫板 (wing imaginal disc) (Cy3 通道, 红色部分), 锯齿状蛋白 (engrailed protein) 显示在 Cy2 通道 (绿色部分) (引自 Paddock, 1999)



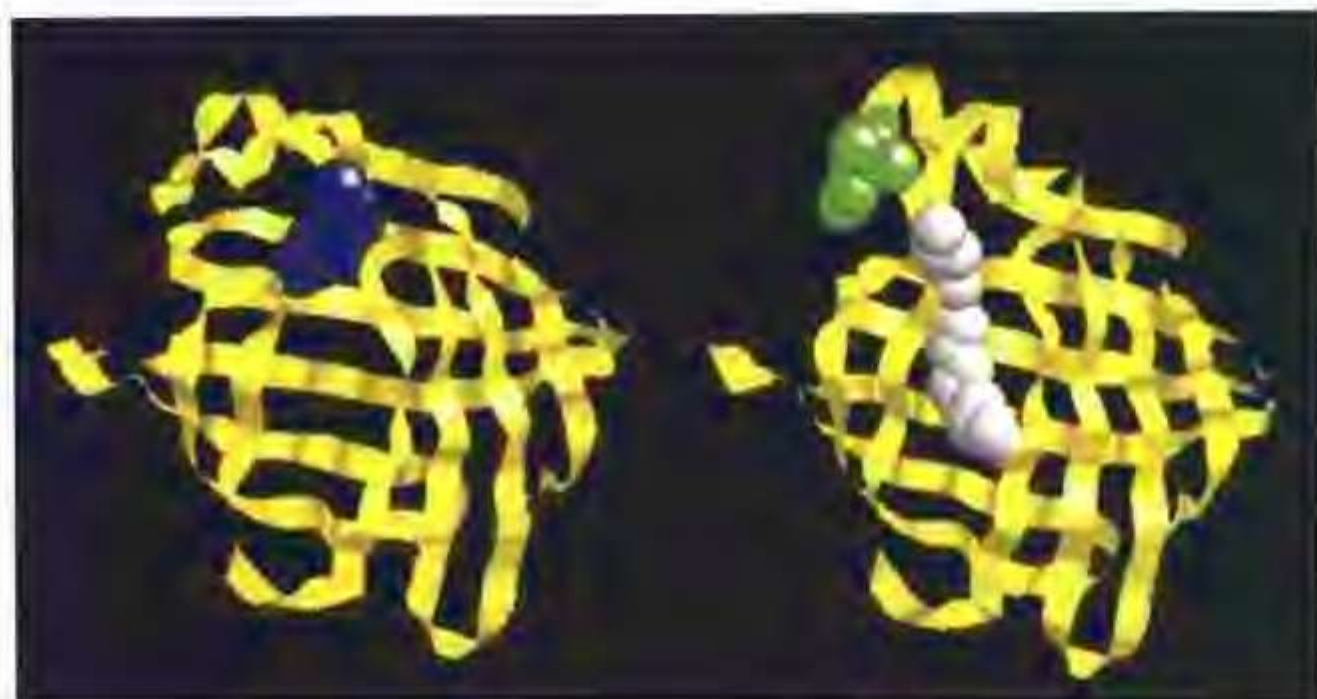
彩图 5 分离的树突状细胞。A: 细胞表面可见明显突起 (透射电镜); B: 细胞内线粒体、溶酶体和少量粗面内质网 (透射电镜); C: 细胞表面可见明显细长指状突起 (扫描电镜); D: 线粒体标记物标记后, 显示线粒体在胞质内的分布 (激光扫描共聚焦显微镜观察)



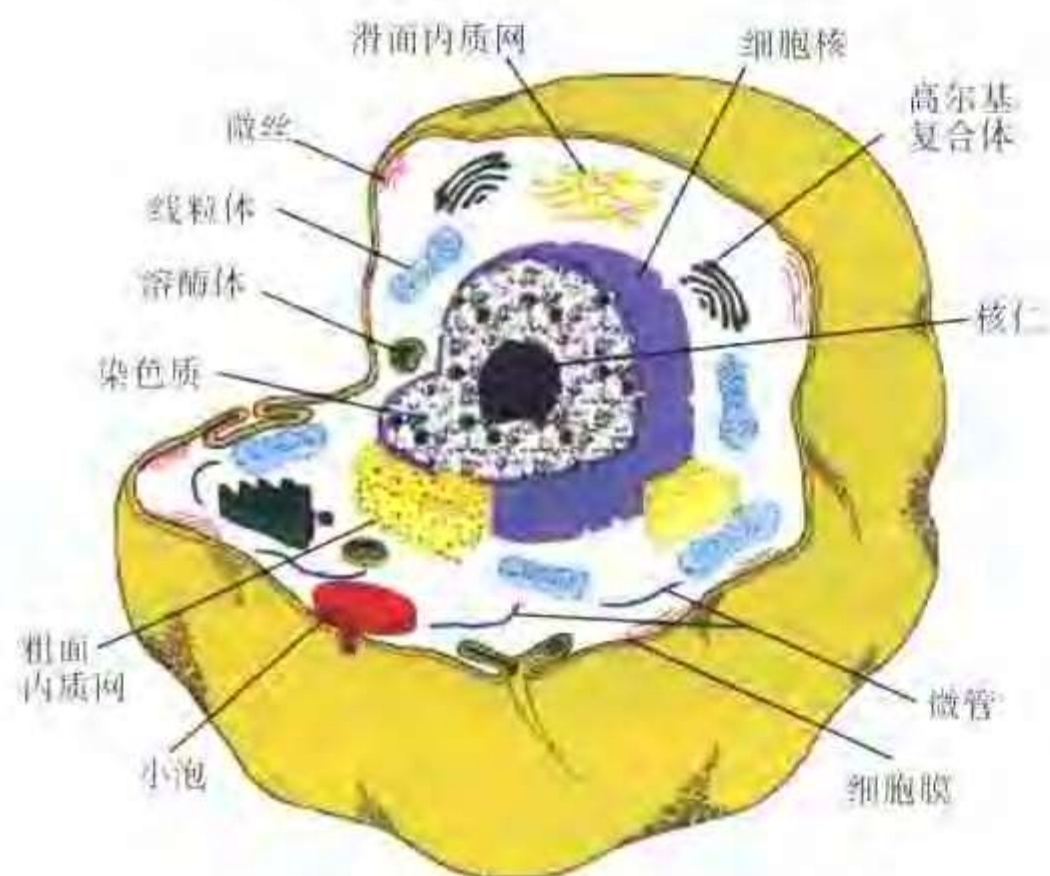
彩图 6 培养的皮肤黑色素细胞。A: 经 actin 标记后, 显示细胞骨架的分布 (激光扫描共聚焦显微镜观察); B: 细胞表面微绒毛明显 (扫描电镜); C: 细胞内含有大量色素颗粒 (透射电镜); D: 细胞内大量色素颗粒 (透射电镜)



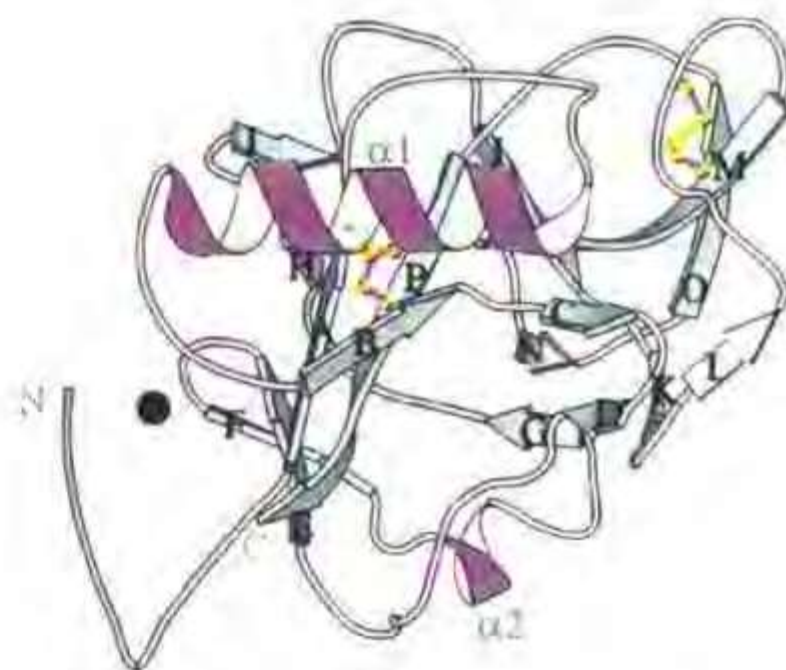
彩图7 牛胚 A: 桑椹胚期微管染色示卵裂球的分布; B: 桑椹胚细胞内高尔基体; C: 囊胚期表皮生长因子受体 (EGF-R) 的表达



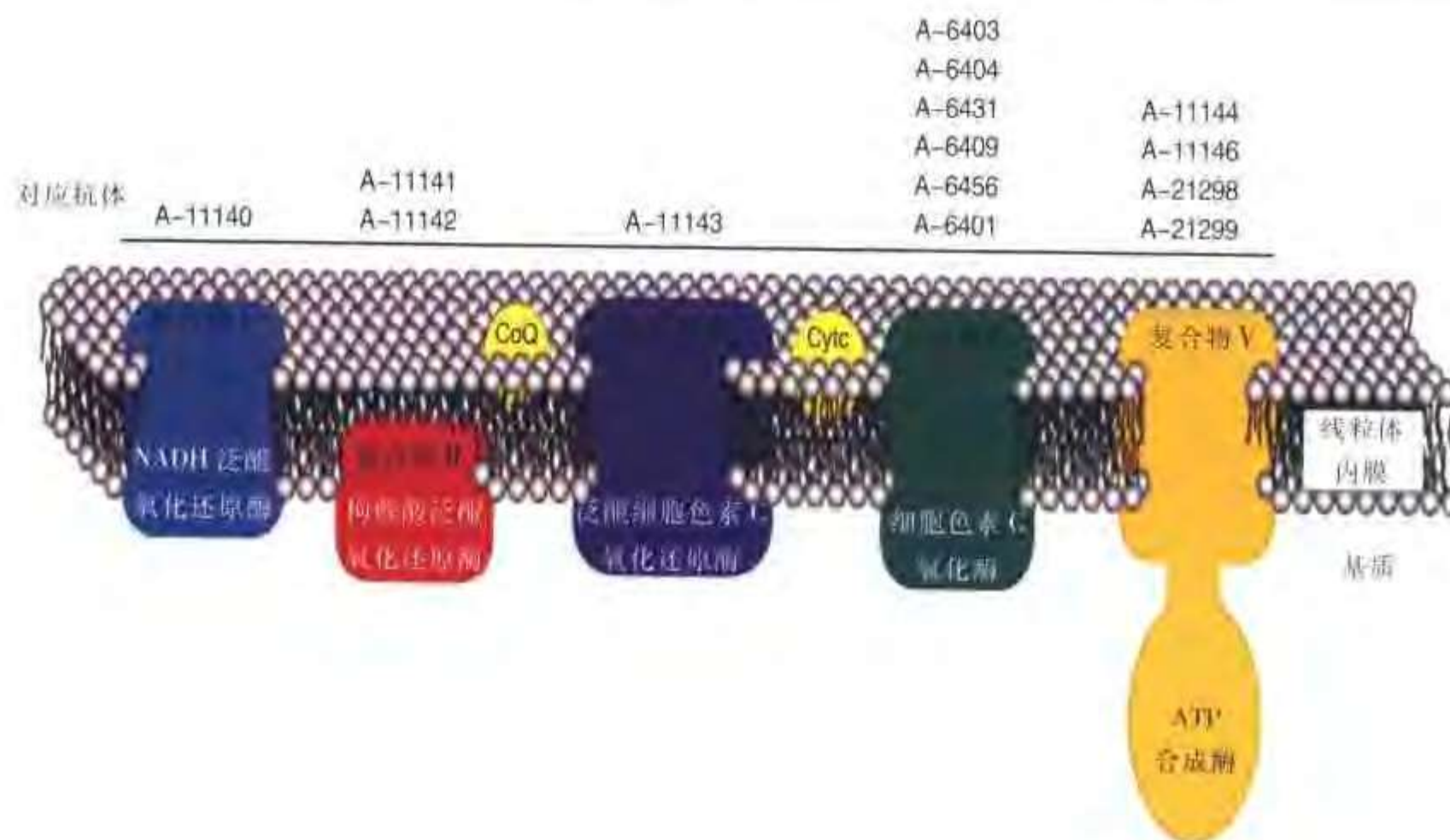
彩图8 ADIFAB 游离脂肪酸指示剂 (A-3880) 的结构模式图。左侧的图像: 肠脂肪酸结合蛋白 (带状物) 的结合位点被共价结合的 acrylodan 荧光团 (球形物) 占据。右侧的图像: 脂肪酸分子 (下方链球状物) 与蛋白结合, 使荧光团 (上方球状物) 发生移位, 同时导致荧光发射光谱的位移 (图像引自 Alan Kleinfeld, FFA Sciences LLC, San Diego)



彩图9 动物细胞的超微结构



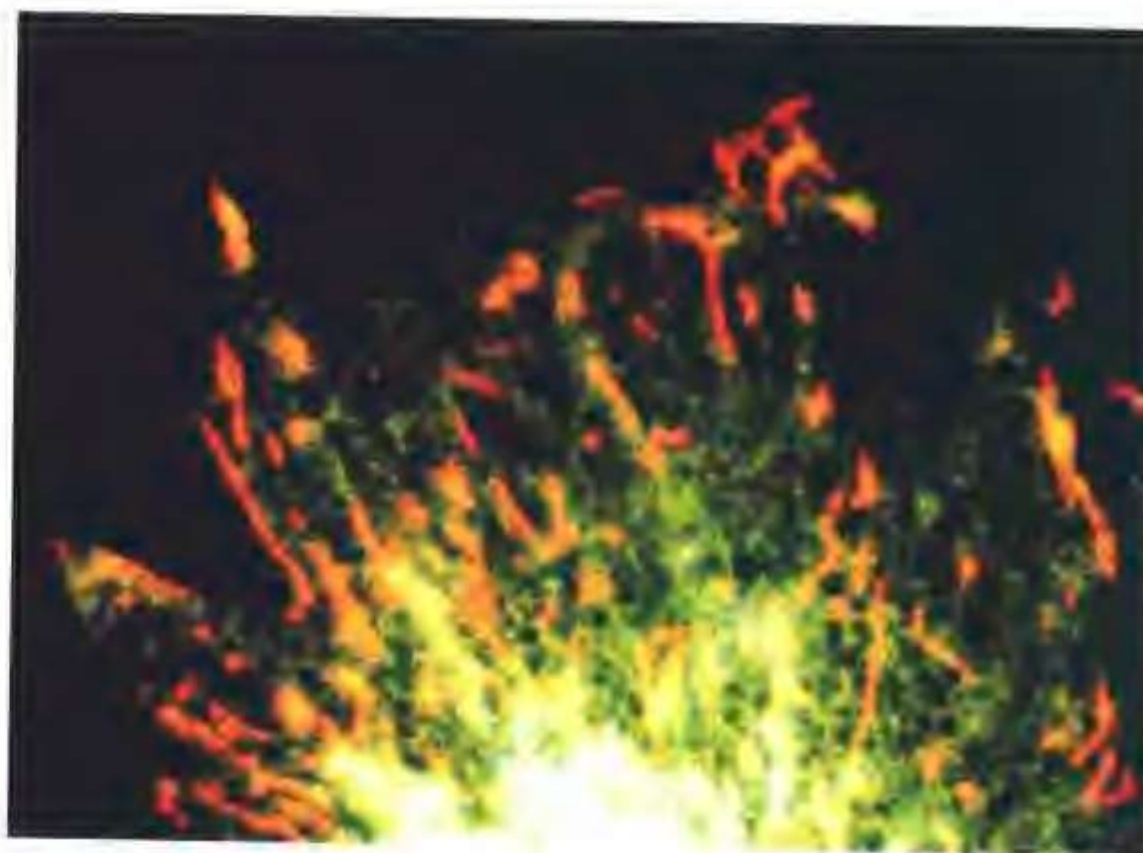
彩图10 重组人内皮抑素蛋白的晶体结构 (图像引自 Entrenmed, Inc.)



彩图 11 氧化磷酸化系统主要的蛋白复合物和识别它们的抗体



彩图 12 固定和穿透的骨肉瘤细胞同时进行荧光植物凝集素 Alexa Fluor 488 concanavalin A (Con A, C-11252) 和 Alexa Fluor 594 麦胚凝集素 (WGA, W-11262) 染色。Con A 选择性地与 β -吡喃葡萄糖残基结合, 而 WGA 选择性一与唾液酸和 N-乙酰葡萄糖胺残基结合。细胞核用蓝色荧光 Hoechst 33342 核酸染料 (H-1399, H-3570, H-21492) 染色。图像采用的带通滤片组为适合 Texas Red 染料, 荧光黄和 AMCA 的滤片 (图像引自分子探针公司资料)



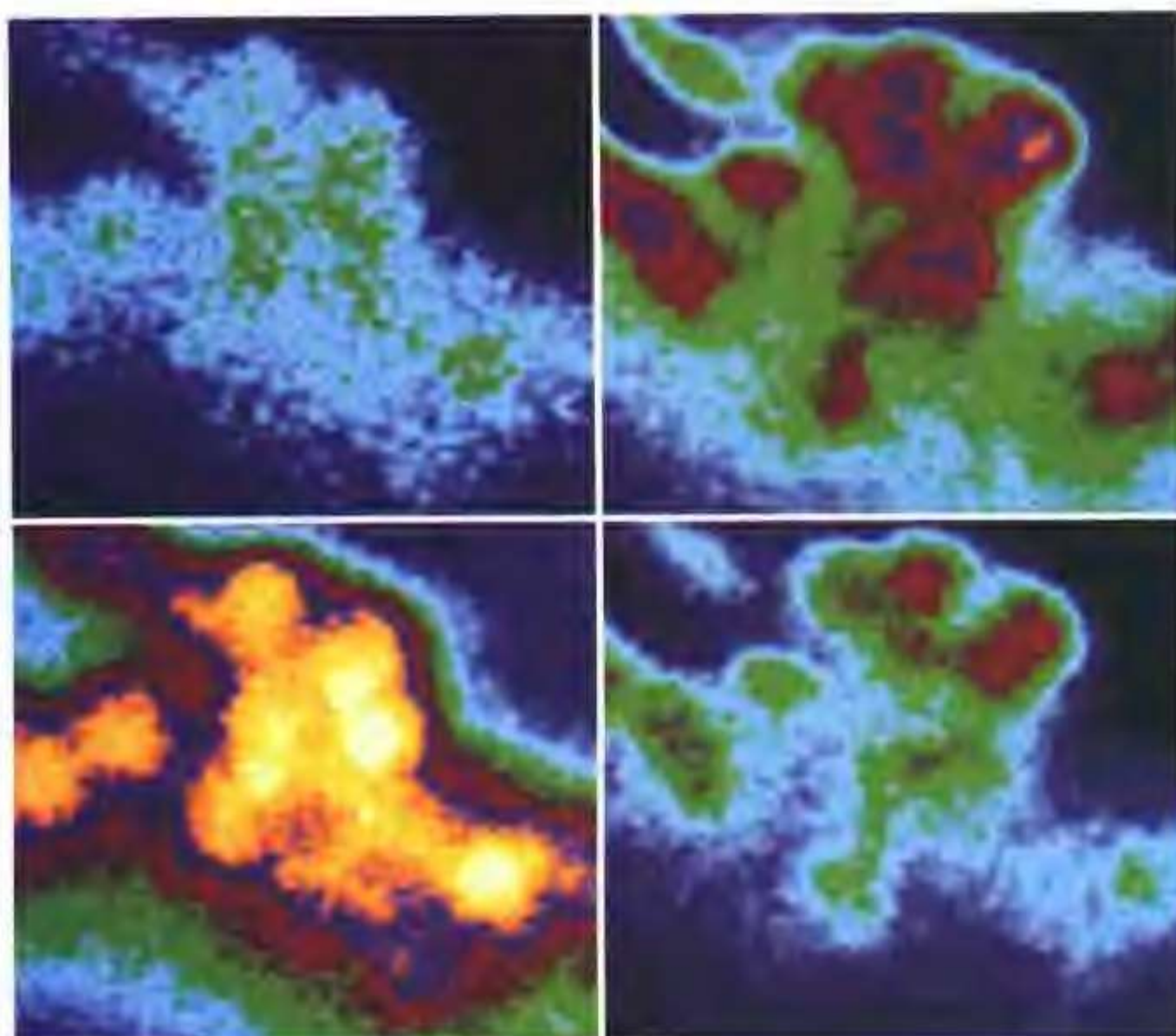
彩图 13 活牛肺动脉内皮细胞用 ER-Tracker Blue-White DPX (E-12353) 和 MitoTracker Red CM-H₂XRos (M-7513) 染色。内质网为绿色。线粒体呈现橙红色。采用三联带通滤片组 (DAPI, 荧光黄和 Texas Red 染料) (图像引自分子探针公司资料)



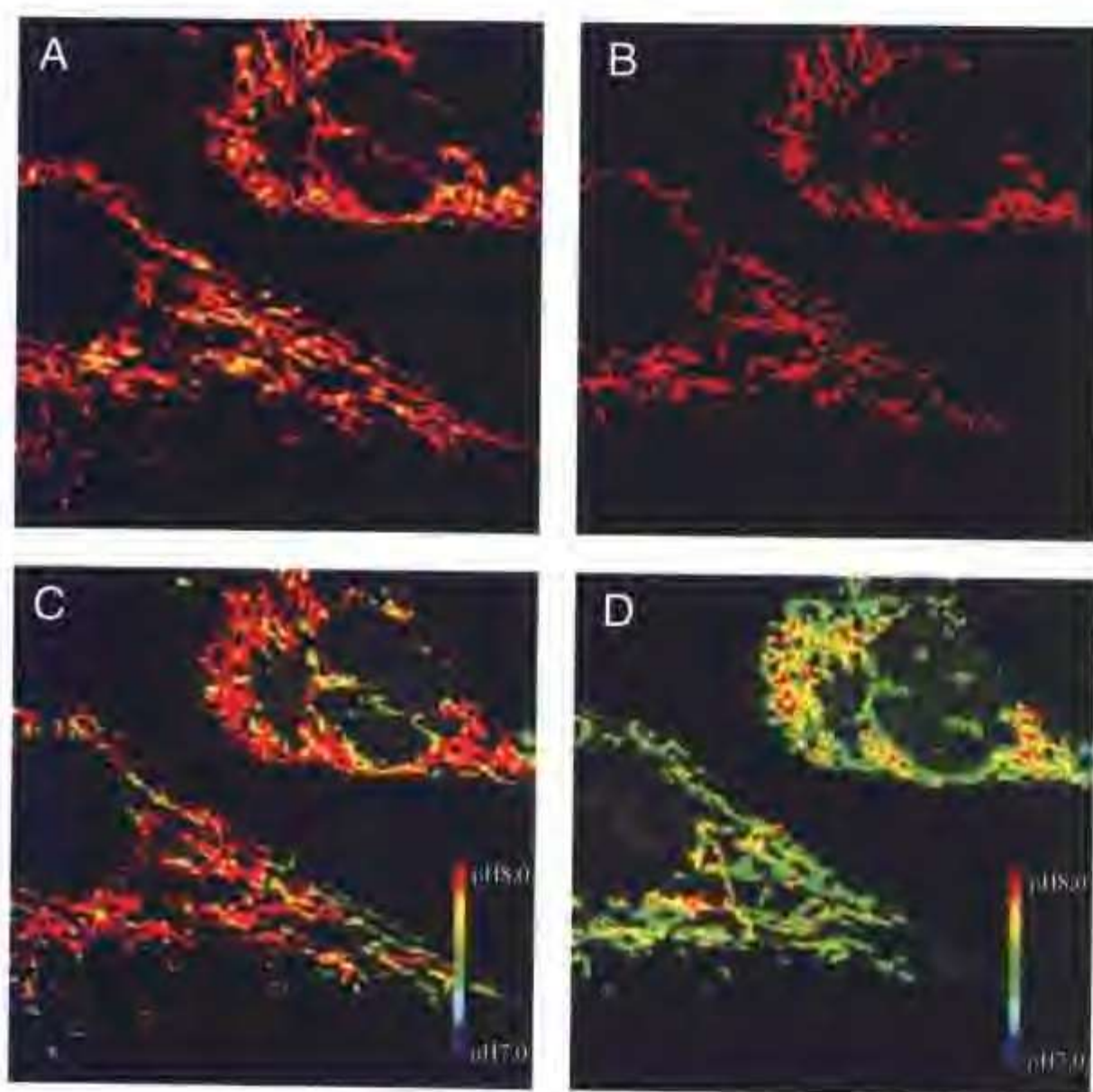
彩图 14 固定、穿透的 HeLa 细胞用抗 golgin-97 抗体 (A-21270) 标记, 并使用 Alexa Fluor 647 山羊抗小鼠 IgG 抗体 (A-21235) 检测。细胞核用 SYTOX Orange 核酸染料 (S-11368) 衬染 (引自分子探针公司资料)



彩图 15 固定牛肺动脉内皮细胞微管用小鼠抗 β -微管蛋白抗体 (A-11126) 标记, 而后用 Alexa Fluor 350 山羊抗小鼠 IgG 抗体 (A-11045) 显色, F-肌动蛋白用 Alexa Fluor 594 次毒蕈环肽 (A-12381) 标记。最后细胞用 Alexa Fluor 488 麦胚凝集素 (W-11261) 孵育染色内体途径成分。循序地使用 DAPI、Texas Red 染料和荧光黄带通滤片组, 叠加得到该图像 (引自分子探针公司资料)



彩图 16 大鼠垂体中间叶促黑色素细胞用 indo-1 AM (I-1203, I-1223, I-1226) 和 羧基 SNARF-1, AM, 乙酸盐 (C-1271, C-1272) 探针标记。左侧显示来自 405nm 和 475 nm 的双发射 Ca^{2+} 探针 indo-1 的伪彩色荧光。右侧显示来自 575nm 和 640nm 的双发射 pH 探针 羧基 SNARF-1 的伪彩色荧光 (引自分子探针公司资料)



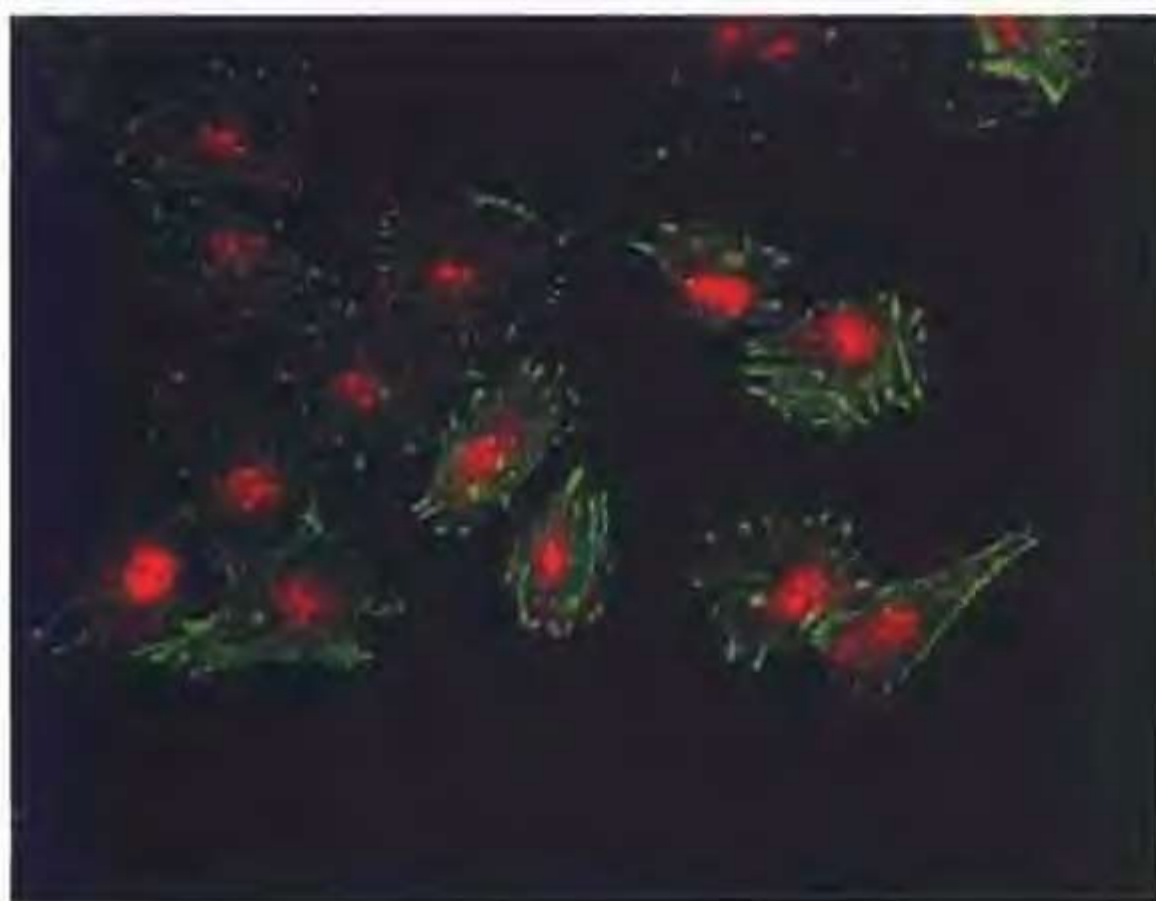
彩图 17 羧基 SNARF-1 对线粒体的选择性负载。BHK 细胞用 $10 \mu\text{mol/L}$ 羧基 SNARF-1, AM, acetate (C-1271, C-1272) 负载 10 min, 然后在室温孵育 4 h。A: 羧基 SNARF-1 线粒体选择性负载的共聚焦图像 (488 nm 激发), 通过 560~600 nm 带通滤片观察; B: 与 A 图同样细胞的共聚焦图像, 使用 605 nm 的二色镜 (dichroic mirror) 和 610 nm 长波通滤片 (longpass filter) 观察; C: 细胞线粒体的比率图像 (A 和 B), 伪彩色代表不同的 pH 水平; D: 随着 $10 \mu\text{mol/L}$ 羧基氰化物 *m*-chlorophenylhydrazine (m-CCCP) 的加入, 线粒体 pH 的变化, 可造成线粒体 pH 的下降 (酸化) [图像由 Brian Herman (University of Texas Health Science Center, San Antonio) 提供, 引自 Biotechniques 2001; 30: 804]



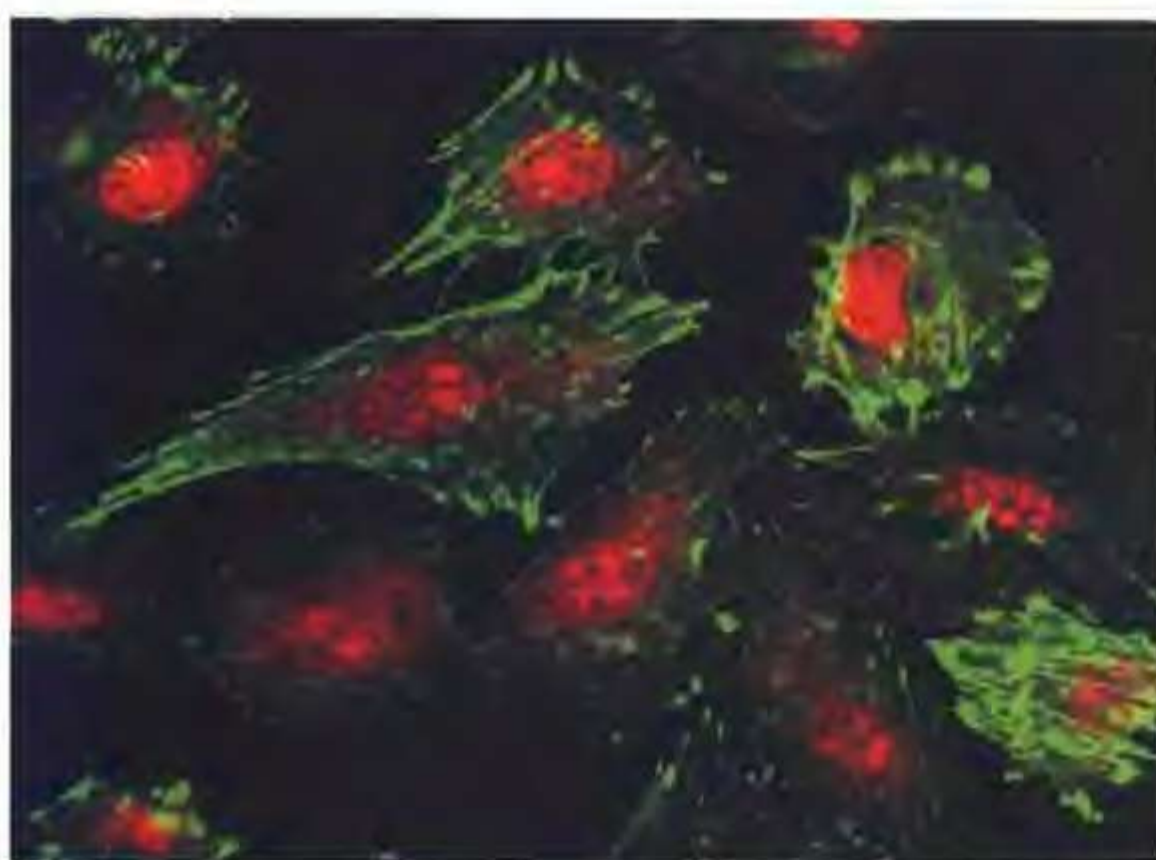
彩图 18 使用 LysoSensor Yellow/Blue DND-160 (1-7545) 进行溶酶体 pH 双发射比率测量。Madin-Darby 犬肾细胞暴露于含有 N-乙基男利酰胺 (N-1495) 和莫能菌素 (monensin) 的 pH-校准缓冲液 (pH 4.5 或 7.0): 这些伪彩色图像来自 $450 \pm 33 \text{ nm}$ 和 $510 \pm 20 \text{ nm}$ 发射波长的图像, 激发波长都是 $365 \pm 8 \text{ nm}$ (引自分子探针公司资料)



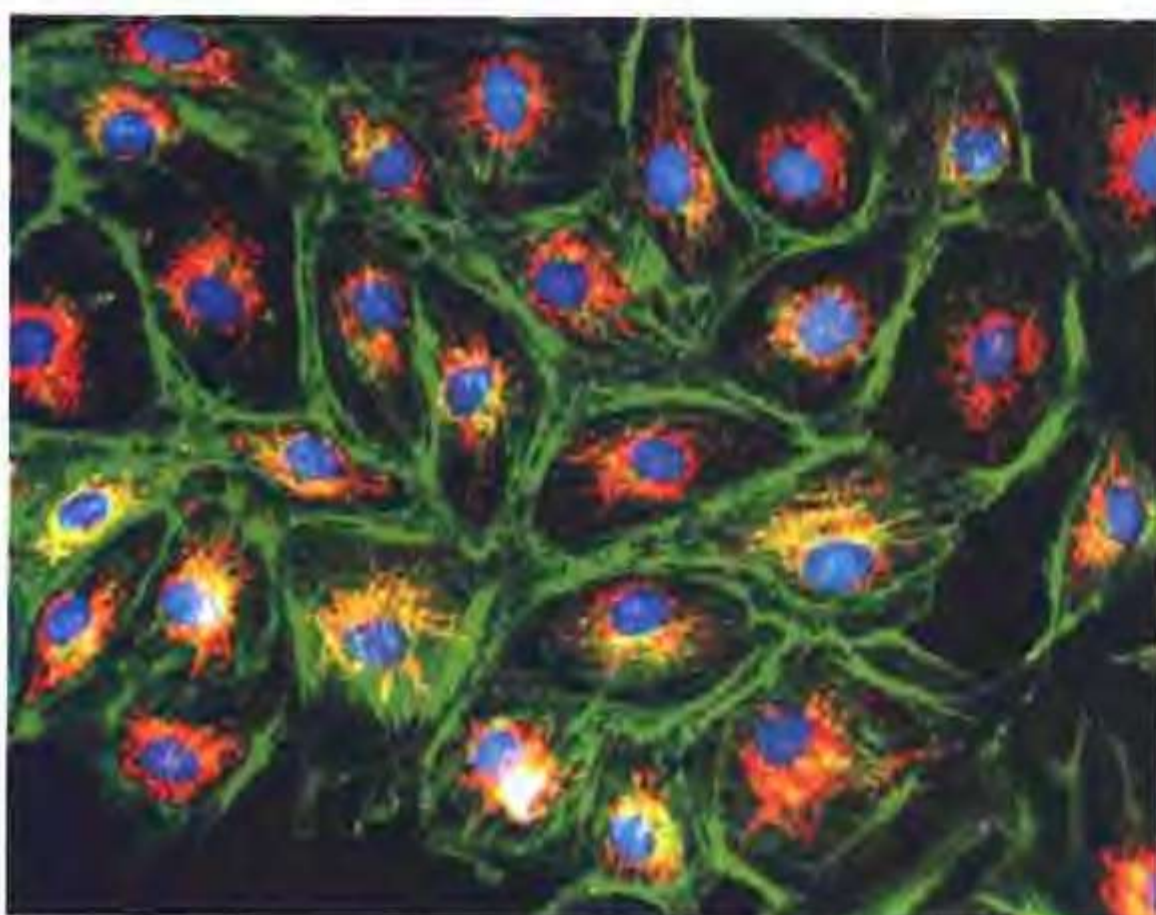
彩图 19 培养的滋养层细胞荧光双标记。FITC 标记 CK18 标记 (绿色), 碘化丙锭 (PI) 标记细胞核 (红色)



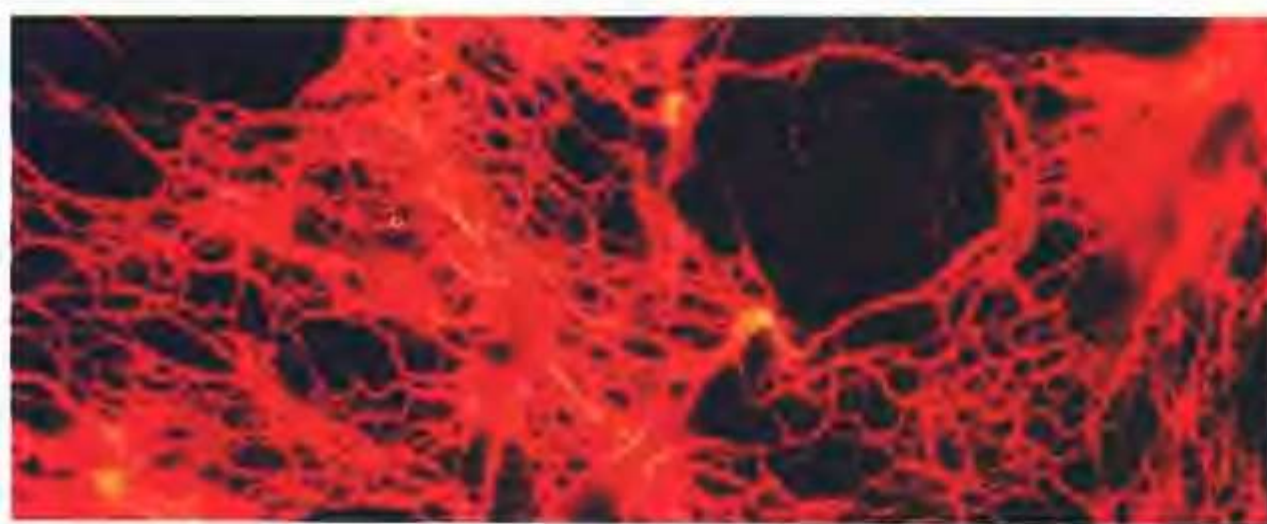
彩图 20 培养的人血管内皮细胞荧光双标记。FITC 标记 Actin (绿色), 碘化丙啶 (PI) 标记细胞核 (红色) (照片由第四军医大学西京医院理疗科王冰水副教授提供)



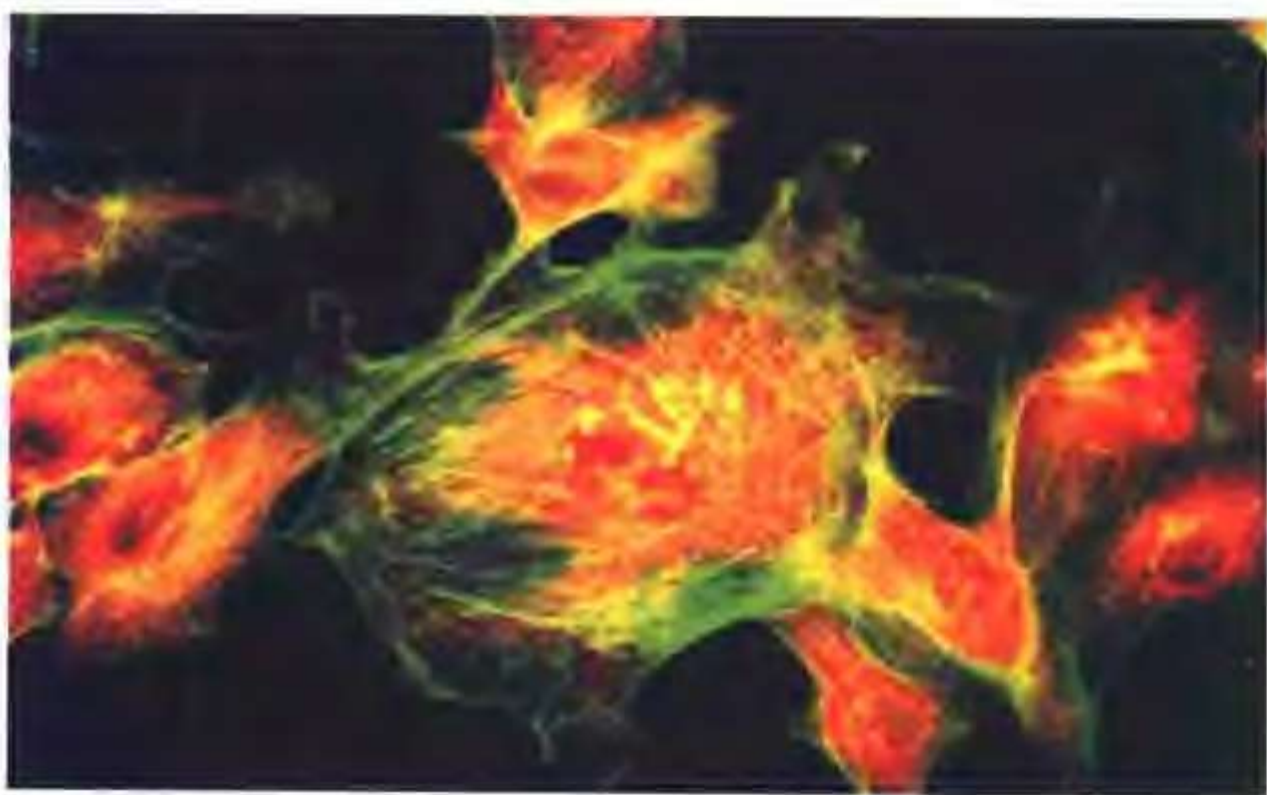
彩图 21 培养的人血管内皮细胞荧光双标记。FITC 标记 Actin (绿色), 碘化丙啶 (PI) 标记细胞核 (红色) (照片由第四军医大学西京医院理疗科王冰水副教授提供)



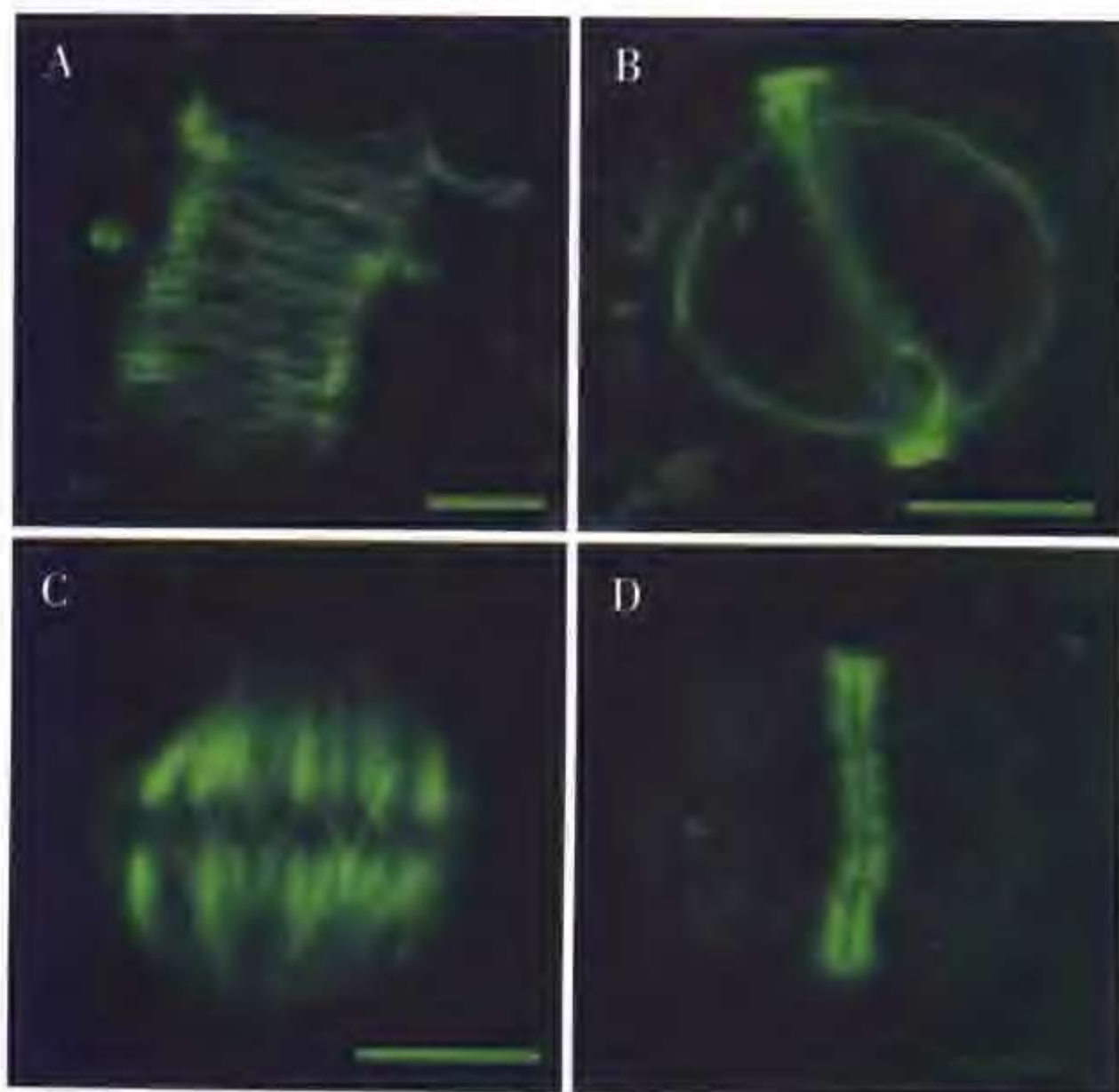
彩图 22 牛肺动脉内皮细胞用 MitoTracker Red CMXRos (M-7512) 标记线粒体, 用 BODIPY FL 毒蕈肽交联物 (B-607) 标记 F-肌动蛋白丝的结果。细胞核用 DAPI (D-1306, D-3571, D-21490) 衬染。使用适合 Texas Red 染料。荧光黄和 DAPI 的滤光片多次曝光后进行图像采集 (引自分子探针公司资料)



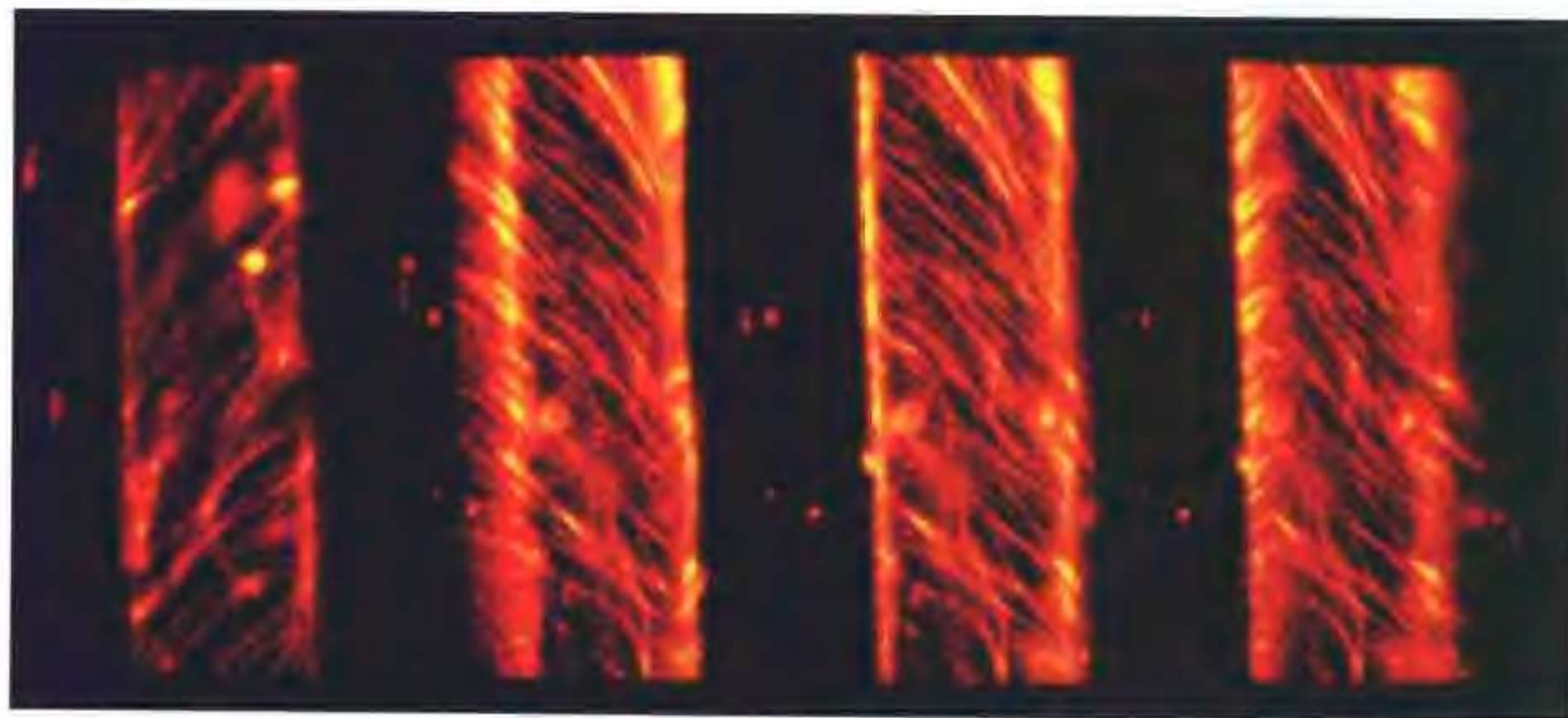
彩图 23 四甲基罗丹明标记的微管蛋白 (T-7460) 与未标记的微管蛋白 (T-7451) 在 G-PEM 缓冲液 (80 mmol/L PIPES, 1 mmol/L $MgCl_2$ 和 1 mmol/L GTP) 中共聚合 10 min 后, 聚合的微管蛋白用含有 60% 甘油和 0.1% 戊二醛的 G-PEM 缓冲液 1:1 000 稀释。60% 甘油和 0.1% 戊二醛的 G-PEM 缓冲液 1:1 000 稀释 (引自分子探针公司资料)



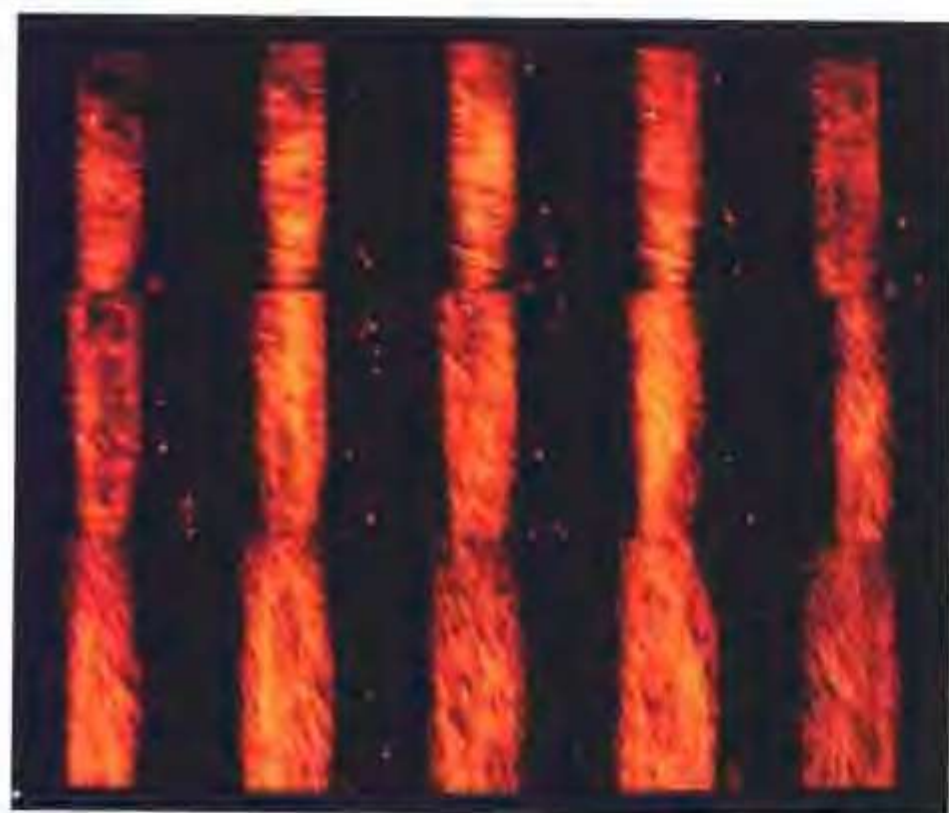
彩图 24 牛肺动脉内皮细胞用 Alexa Fluor 488 次毒甾环肽 (A-12379) 标记 F-肌动蛋白 (绿色) 用小鼠抗 β -微管蛋白抗体 (A-11126) 结合 Alexa Fluor 594 染料交联的山羊抗小鼠 IgG 抗体 (A-11020) F(ab')₂ 片段染色微管 (红色) 所得的结果。使用适合 Texas Red 染料和荧光黄的带通滤片组多次曝光的图像 (引自分子探针公司资料)



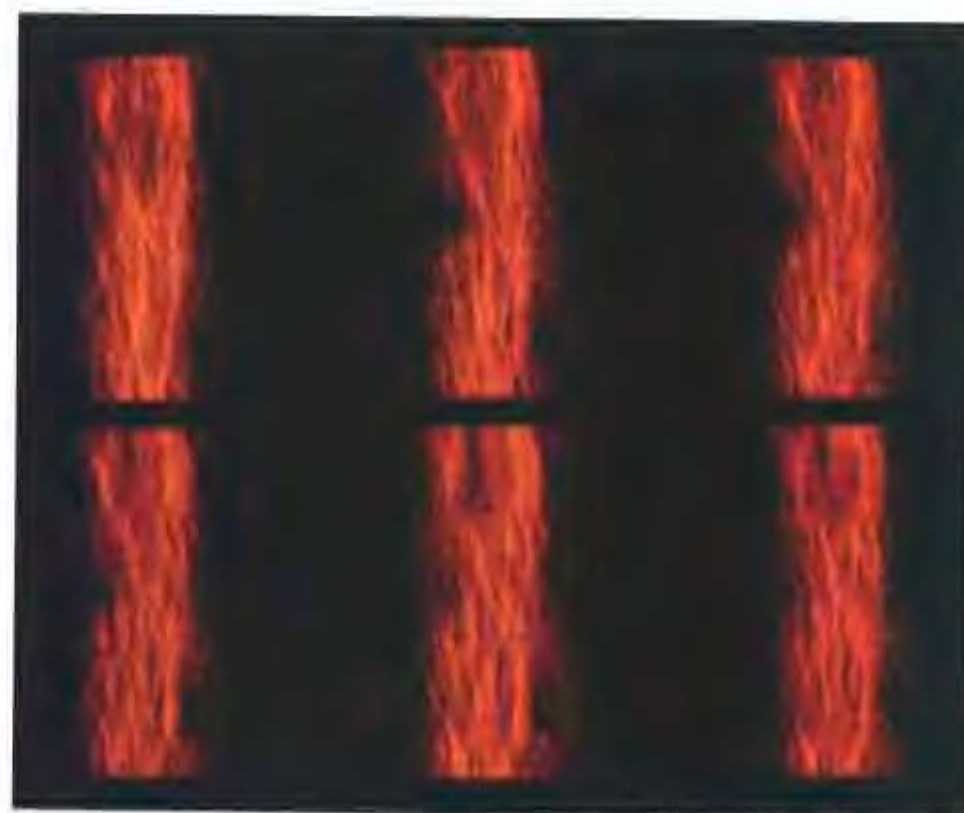
彩图 25 植物细胞中四种典型的微管阵列的共聚焦显微镜图像。A: 间期细胞周质微管; B: 早前期微管带; C: 纺锤体微管; D: 成膜体



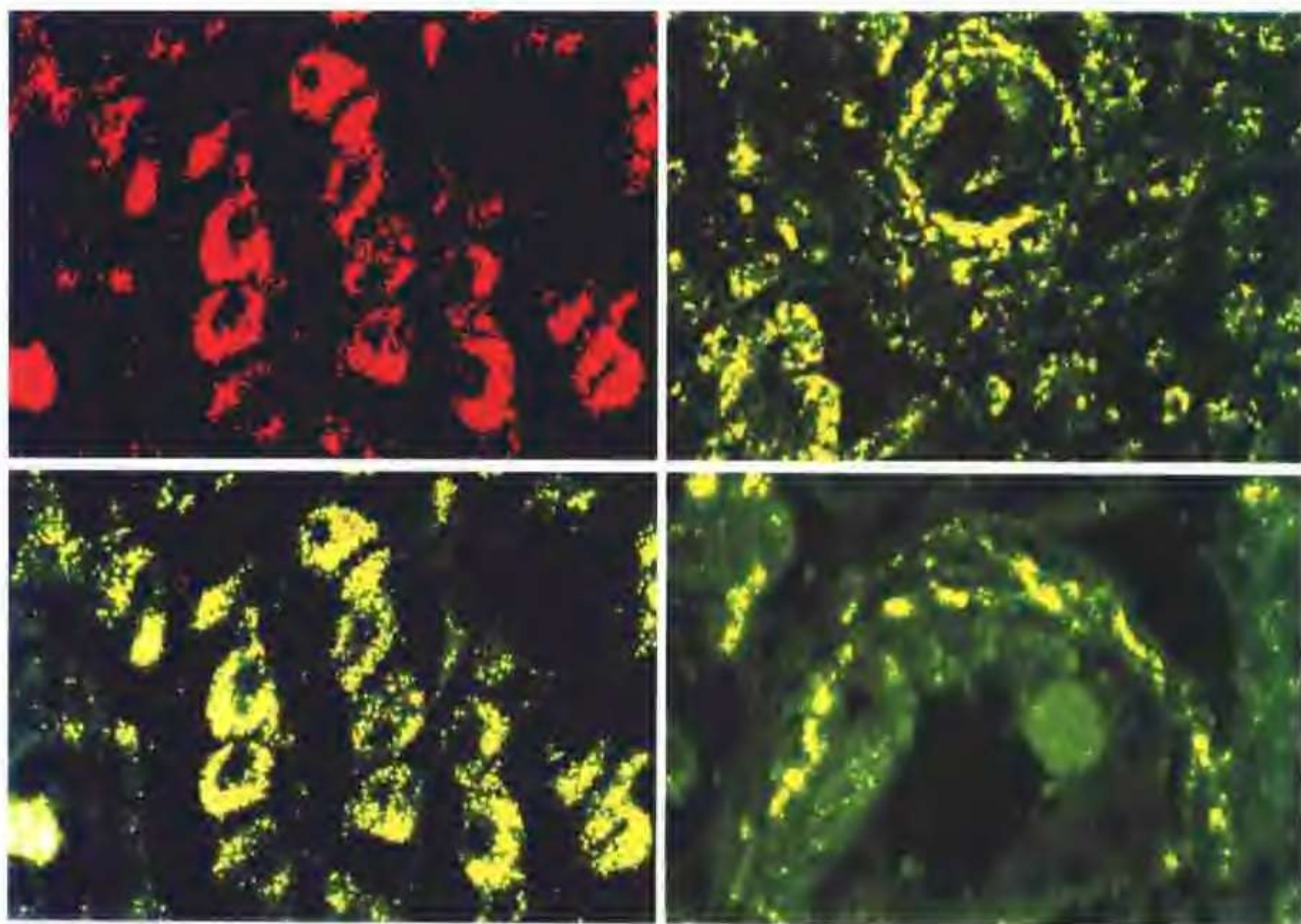
彩图 26 共聚焦显微镜所揭示的植物细胞周质微管的三维排列结构。图为豌豆茎表皮细胞的四个侧壁面的微管排列，从左至右分别为：背向侧壁面的微管，左侧壁面的微管，面向侧壁面的微管，右侧壁面的微管



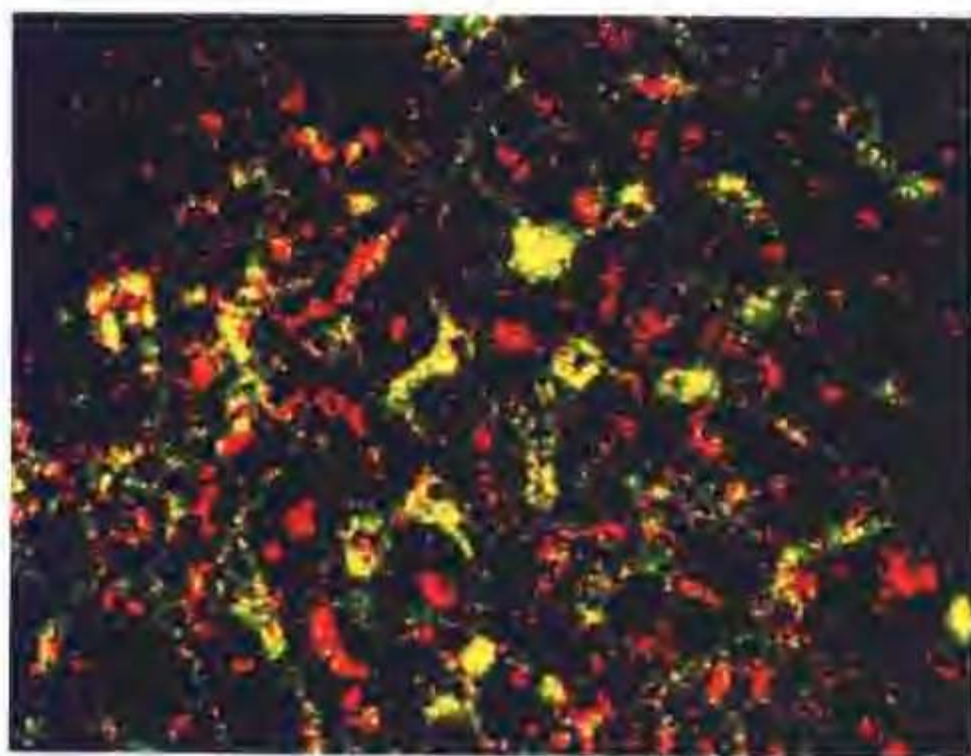
彩图 27 活体植物细胞微管列阵重新排列的共聚焦显微镜记录。图中显示的是豌豆表皮细胞周质微管由横向排列转变为纵向排列的过程。各图像记录的时间间隔约为 6min



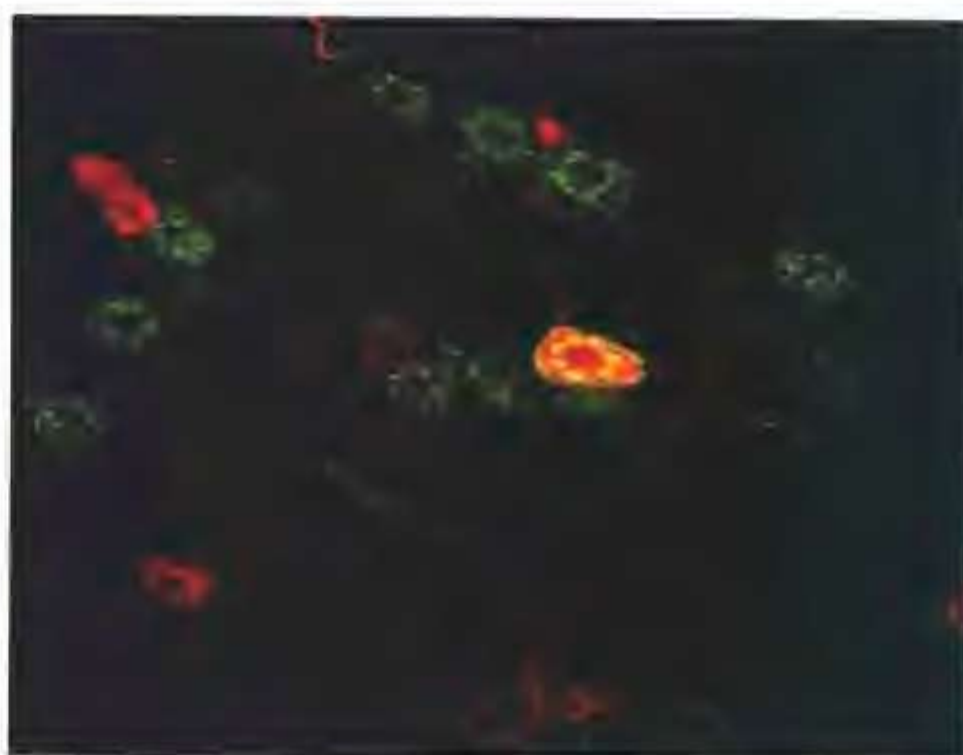
彩图 28 植物细胞微管的荧光漂白恢复过程的共聚焦显微镜记录。右上第一个图像为荧光漂白前的微管图像，之后由左至右为荧光漂白后的恢复过程，各图像间的记录时间间隔约 1min



彩图 29 胰腺导管癌细胞表达嗜铬颗粒素 C 和胰抑素。图中红色荧光为嗜铬颗粒素 C 免疫反应阳性物质，绿色荧光为胰抑素免疫反应阳性物质，黄色荧光为嗜铬颗粒素 C 和胰抑素共存部位（原图发表在世界华人消化杂志封面 1998；6（6）：470~473）



彩图 30 组织蛋白酶 D 和嗜铬颗粒素 A 在人原发性肝细胞癌的表达。图中红色荧光为组织蛋白酶 D 免疫反应阳性物质，绿色荧光为嗜铬颗粒素 A 免疫反应阳性物质，黄色荧光为嗜铬颗粒素 A 和组织蛋白酶 D 共存部位（原文发表在世界华人消化杂志 1998；6（6）：474~478）



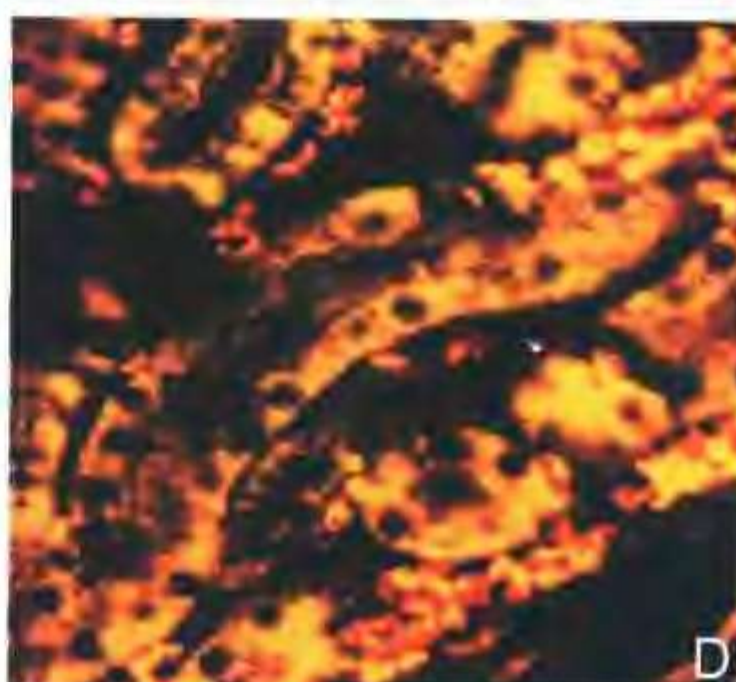
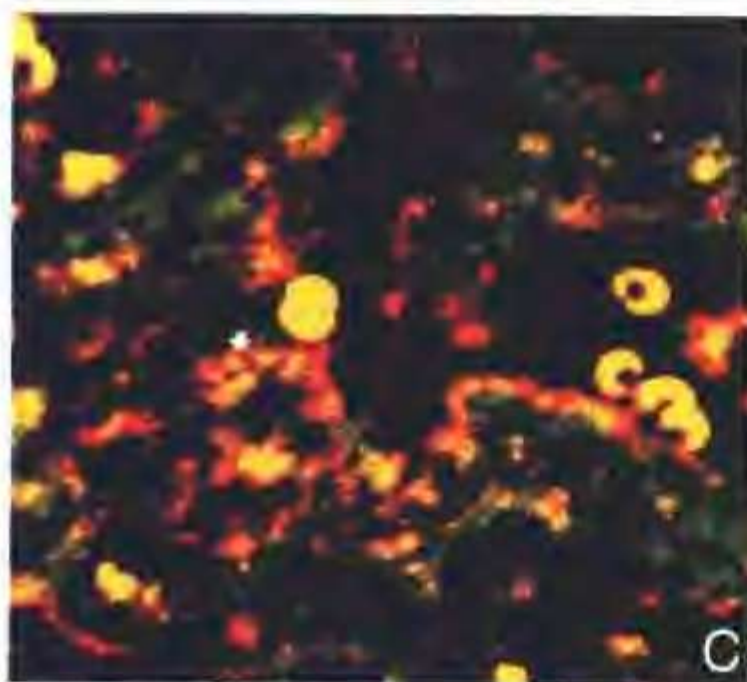
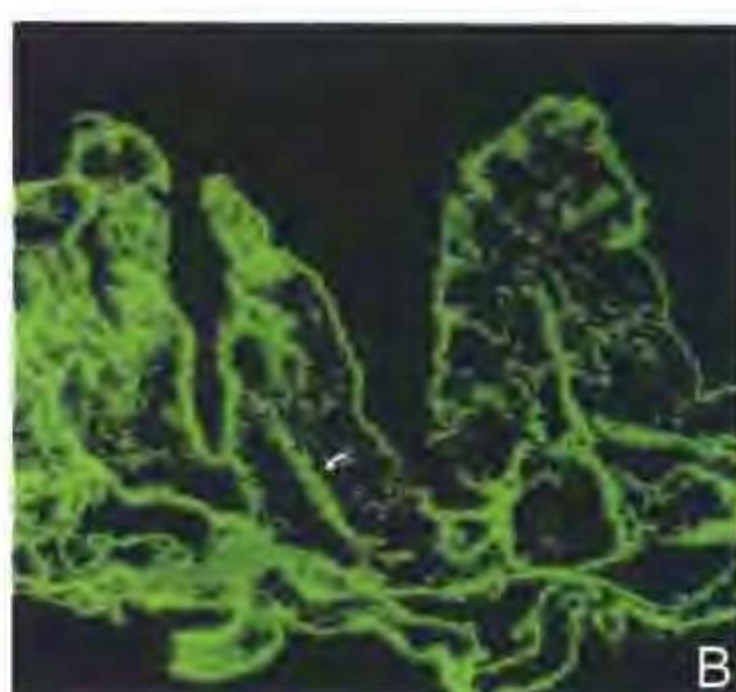
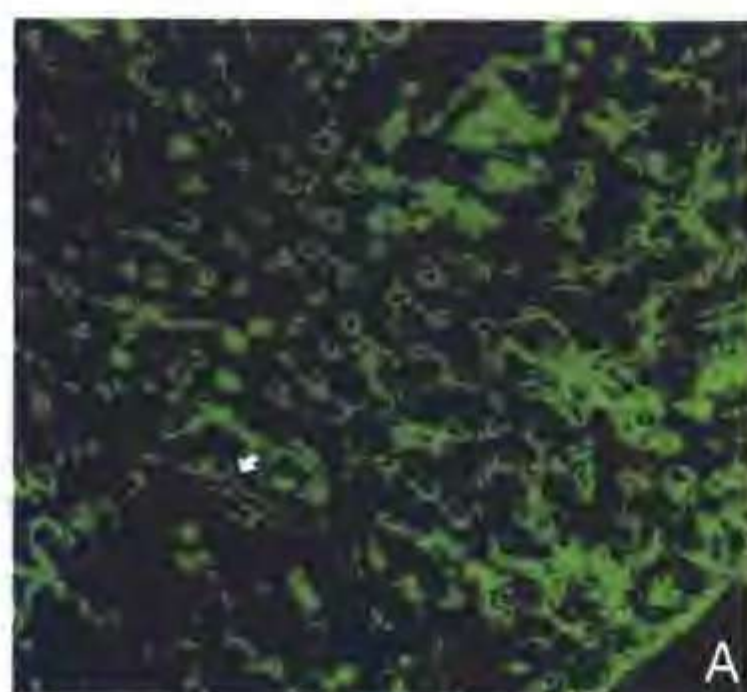
彩图 31 三叉神经半月节荧光双标记。绿色为 FITC 标记的 IB4 细胞，红色为 Texas Red 标记的 SP 免疫反应阳性细胞（照片由第四军医大学基础部解剖学教研室张文斌教授提供）



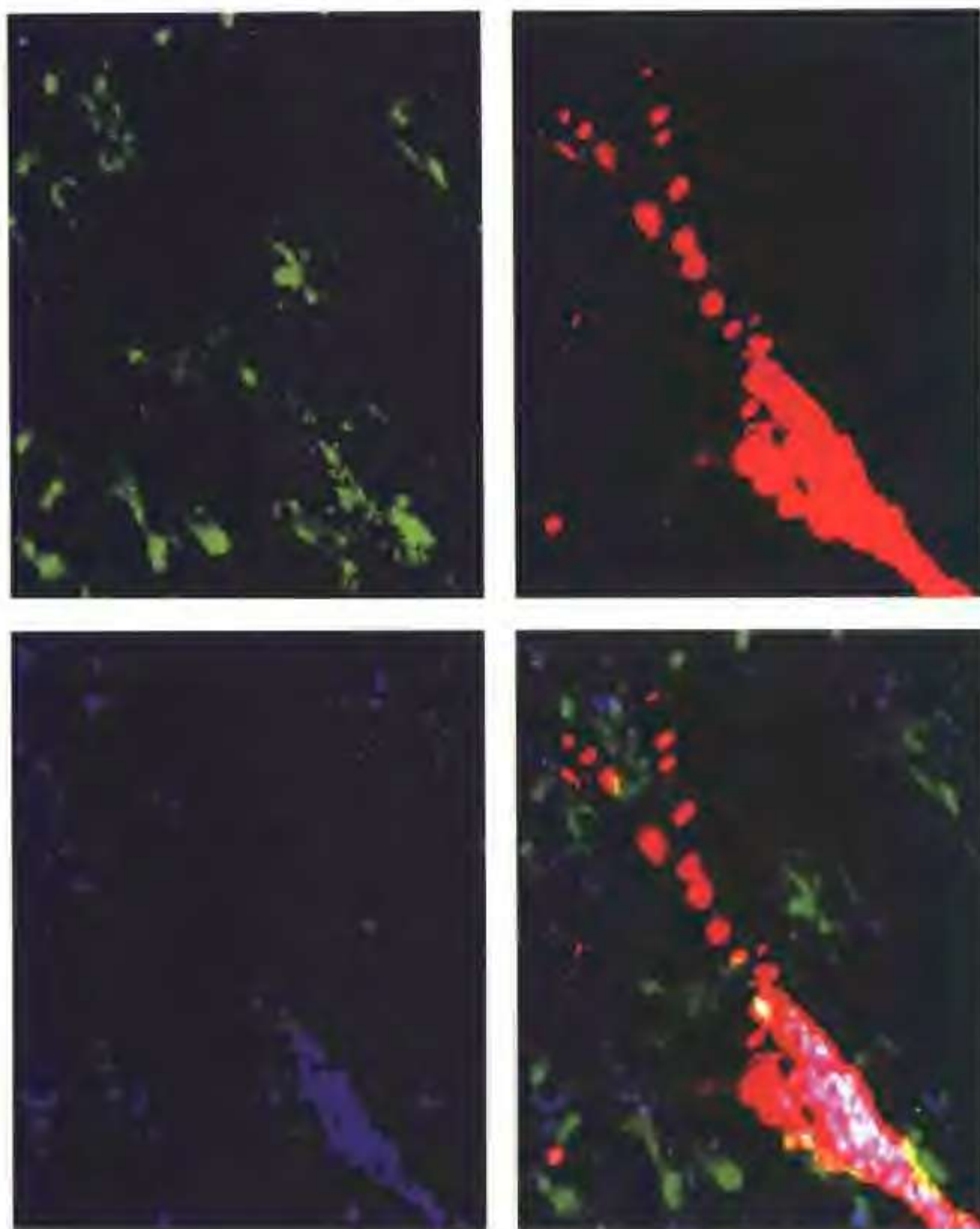
彩图 32 脊髓后根神经节荧光双标记。绿色为 FITC 标记的 IB4 细胞，红色为 Texas Red 标记的 SP 免疫反应阳性细胞（图片由第四军医大学基础部解剖学教研室张文斌教授提供）



彩图 33 迷走神经结状节荧光标记结果。绿色为 FITC 标记的 IB4 细胞，红色为 Texas Red 标记的 SP 免疫反应阳性细胞（图片由第四军医大学基础部解剖学教研室张文斌教授提供）



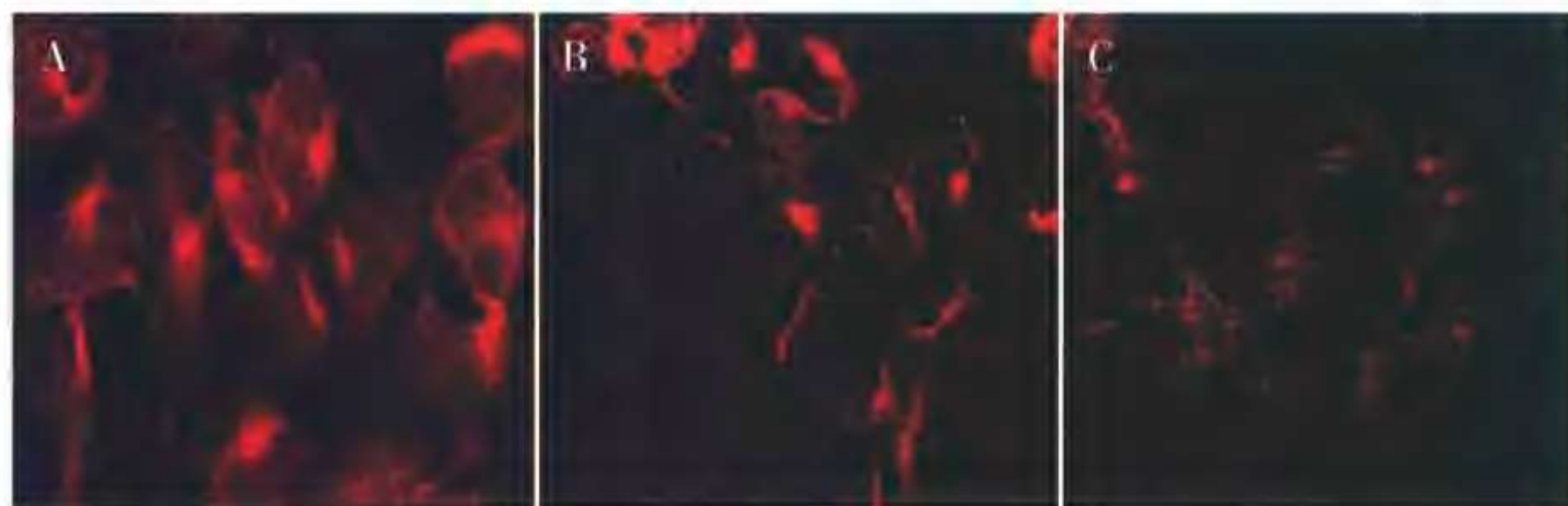
彩图 34 可溶性免疫复合物在肾综合征出血热发病中的作用。A：可溶性免疫复合物注射后 24h 的小鼠肝脏（FITC 标记显示 HFRS 抗原呈绿色）；B：可溶性免疫复合物注射后 24h 的小鼠小肠黏膜（FITC 标记 HFRS 抗原呈绿色）；C：可溶性免疫复合物注射后 48h 的肝脏；D：可溶性免疫复合物注射后 72h 的肾小管。FITC 标记 IgG-绿色，Texas Red 标记 HFRS 抗原-红色，共存部位为黄色（原文发表于第四军医大学学报 1997；18（专刊）：4-7）



彩图 35 三叉神经脊束间质核荧光标记观察。红色为 TMR 注射入臂旁核逆行追踪标记的细胞，绿色为 FITC 标记的 5-HT 终末和纤维，蓝色为 Cy5 标记的 TH 免疫阳性细胞（图片由第四军医大学基础部解剖学教研室张文斌教授提供）



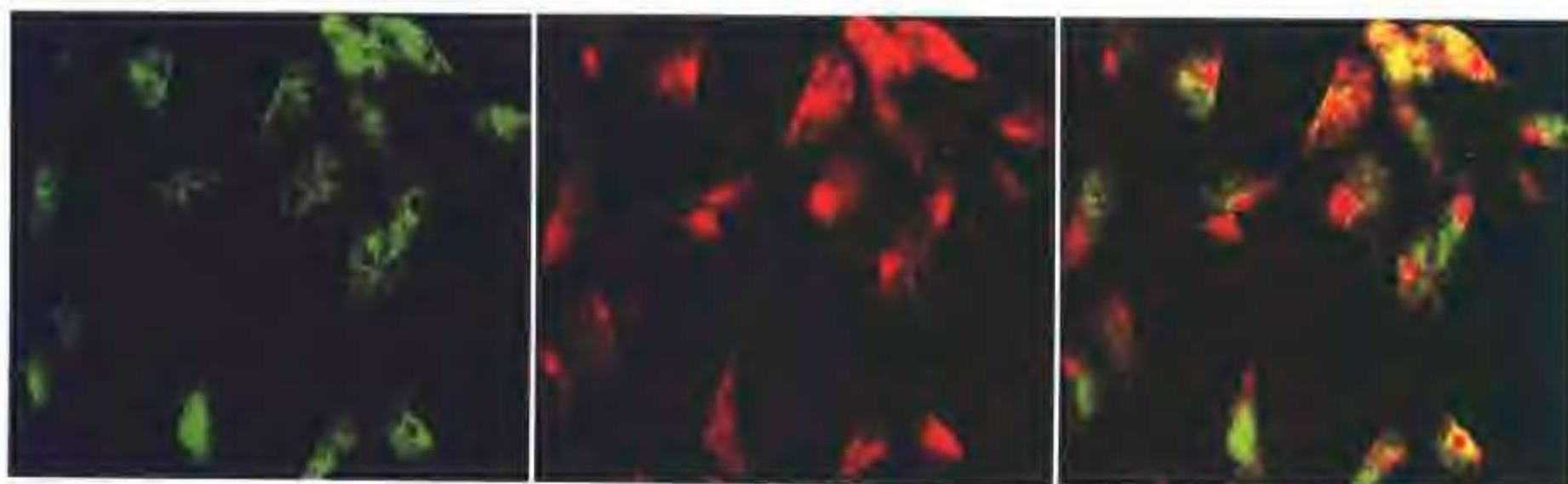
彩图 36 MT4 细胞 HAB18G/CD147 及其拮抗肽的双重染色共聚焦图像。采用 HAB18G/CD147-羊抗鼠 FITC（绿色）和生物素-AP9（CD147 拮抗肽）-卵白素-Cy3（红色）双重染色共聚焦显微观察结果：荧光复合物 HAB18G/CD147 与 AP9 均位于细胞及胞浆质膜上同一位点呈双色反应（黄色）



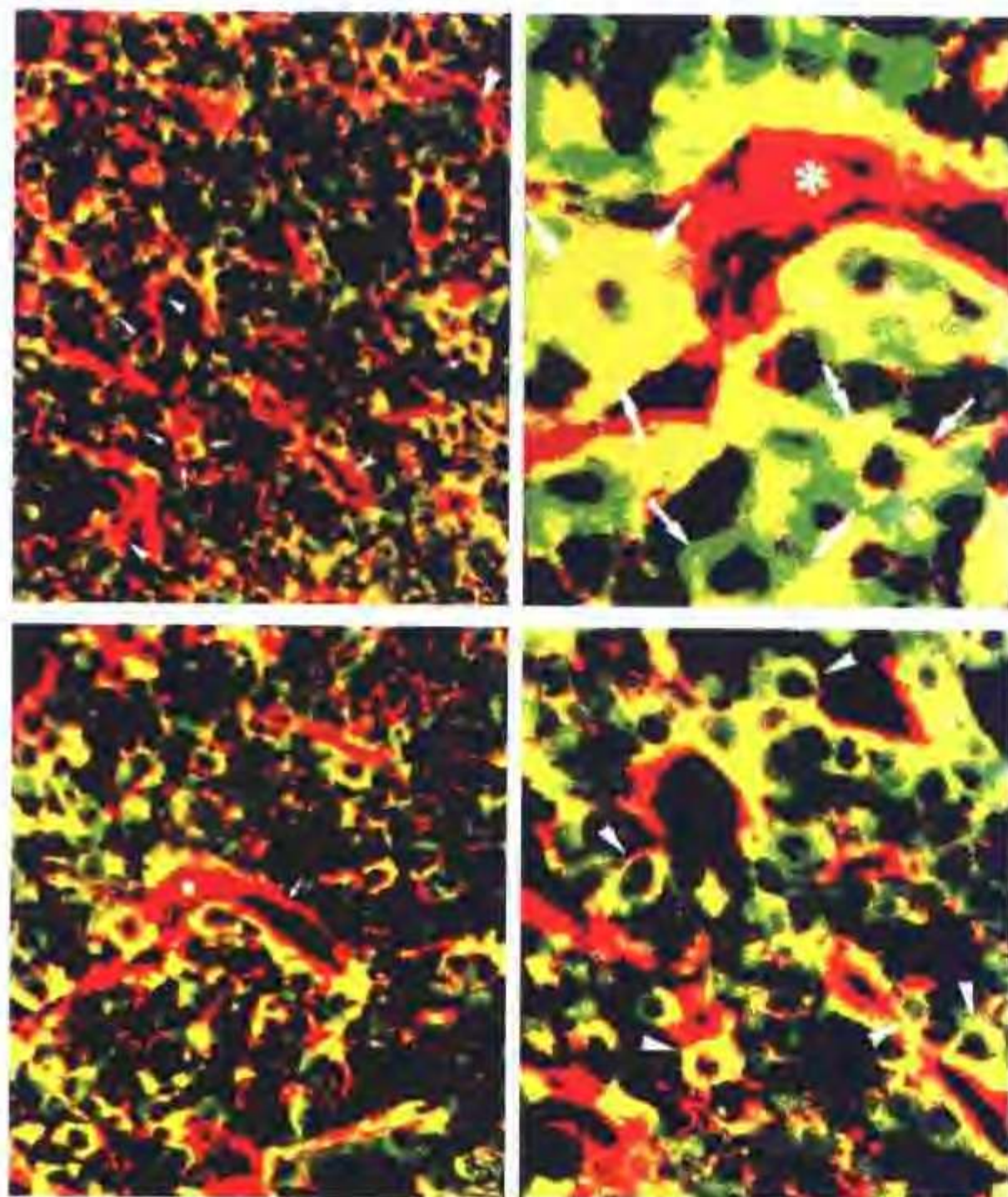
彩图 37 293 细胞 HAb18G/CD147 拮抗肽染色共聚焦图像。A: 为生物素-AP9 (CD147 拮抗肽)-卵白素-Cy3 染色 (红色); B: 经 CD147 封闭后的生物素-AP9 (CD147 拮抗肽)-卵白素-Cy3 染色; C: 阴性对照



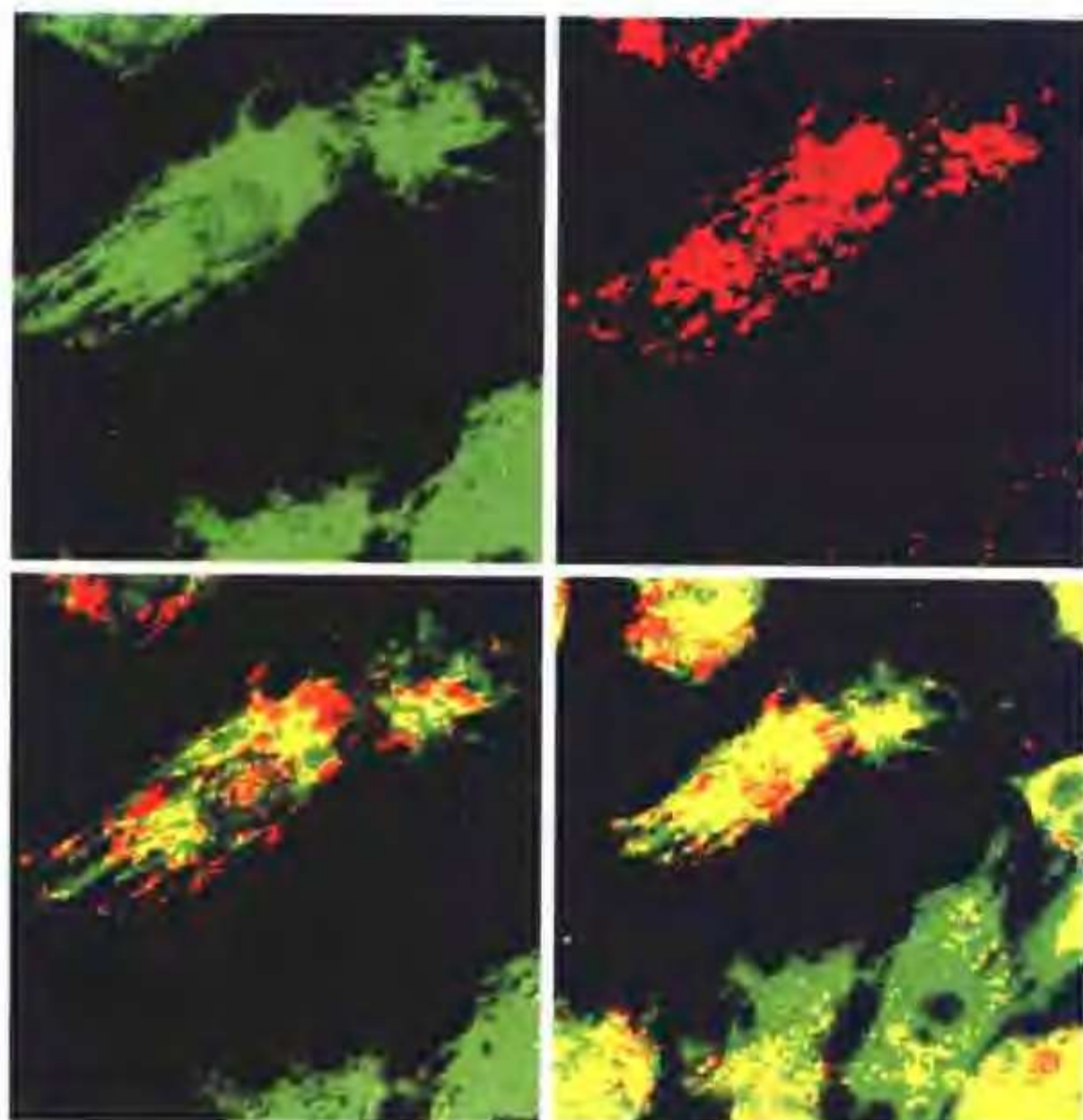
彩图 38 Vero E6 细胞 HAb18G/CD147 及其拮抗肽的双重染色共聚焦图像。采用 HAb18G/CD147-羊抗鼠 FITC (绿色) 和生物素-AP9 (CD147 拮抗肽)-卵白素-Cy3 (红色) 双重染色共聚焦显微镜观察结果: 荧光复合物 HAb18G/CD147 与 AP9 均位于细胞及胞浆质膜上同一位点呈双色反应 (黄色)



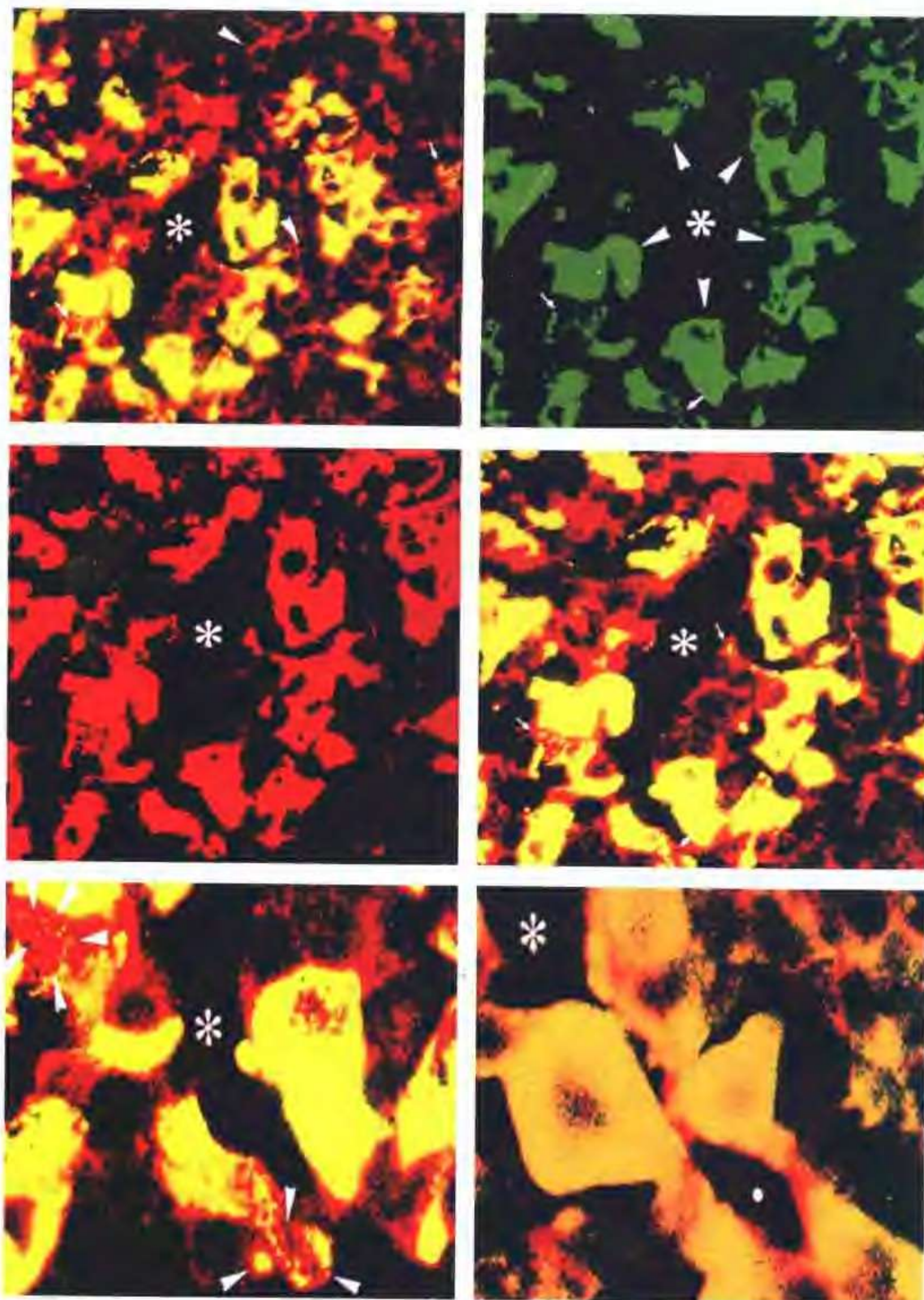
彩图 39 293 细胞 HAb18G/CD147 及其拮抗肽的双重染色共聚焦图像。图中采用 HAb18G/CD147-羊抗鼠 FITC (绿色) 和生物素-AP9 (CD147 拮抗肽)-卵白素-Cy3 (红色) 双重染色共聚焦显微镜观察结果: 荧光复合物 HAb18G/CD147 与 AP9 均位于细胞及胞浆质膜上同一位点呈双色反应 (黄色)



彩图 40 突触囊泡转运蛋白和催乳素在垂体前叶共存观察。FITC 标记催乳素 (绿色), Texas Red 标记突触囊泡转运蛋白 (红色), 二者共存部位为黄色 (原文发表于第四军医大学学报 1997; 18 (专刊): 27-29)



彩图 41 心肌细胞内线粒体和波形蛋白的表达。用 MitoTracker 标记线粒体 (红色), FITC 标记波形蛋白 (绿色) (原文发表于第四军医大学学报 2002; 23 (11): 983-985)



彩图 42 嗜铬颗粒素 C 在垂体前叶的免疫组织化学定位及其与促肾上腺皮质激素细胞的关系。Texas Red 标记嗜铬颗粒素 C (红色), FITC 标记 ACTH (绿色), 二者共存部位为黄色 (原文发表于第四军医大学学报 1997; 18 (专刊): 8~10)

解放军医学图书馆[书]



C0250944

封面页
书名页
版权页
前言
目录
正文